ثبت و شناسایی ژن‌های توکسیک *S.aureus* جدا شده از ماهی تیلاپیا با تکنیک Multi plex PCR

نازنین نیاخلیلی[a]، حامد اهری[b]*، بهاره نوروزی[c]

[a] *دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.*
[b] *استاد گروه مهندسی کشاورزی- صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.*
[c] *استادیار گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۴/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۶/۲۸
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.2.5.5 DOI:10.30495/JFTN.2022.66835.11210

چکیده

مقدمه: آبزیان به دلیل کالری و پروتئین بالا و همچنین وجود چربی غیراشباع امگا ۳ از اهمیت بسزایی در سبد غذایی برخوردارند. در مراحل مختلف از زمان صید تا رسیدن به دست مصرف‌کننده، همواره ممکن است بسیاری از آبزیان از جمله ماهی به برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا آلوده شوند و در نهایت مسمومیت شدید را برای افراد ایجاد نمایند. در پژوهش حاضر به بررسی ثبت و شناسایی ژن‌های توکسیک *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ماهی تیلاپیا با تکنیک Multi plex PCR پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: تعداد کل نمونه‌ها ۴۲ عدد (۲۱ عدد نمونه ماهی تازه و ۲۱ عدد نمونه ماهی منجمد) مدنظر قرار گرفته شد. ابتدا پس از آماده‌سازی نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شد و به صورت کشت سطحی در محیط برد پارکر مورد بررسی قرار گرفت، سپس تست کوآگولاز انجام شد و در مرحله بعد با استخراج DNA ژن انتروتوکسیک شناسایی شد. در نهایت توالی‌یابی ژن به صورت اتوماتیک و دستگاهی انجام گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های به دست آمده نشان داد، ۹۲/۹ درصد از کل نمونه‌های مورد بررسی (۲۱ عدد ماهی تیلاپیا تازه و ۱۸ عدد ماهی منجمد) فاقد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و ۷/۱ درصد از کل نمونه‌ها آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شدند. نتایج بررسی تست کوآگولاز نیز نشان داد، هر سه نمونه ماهی منجمد مورد بررسی، کوآگولاز مثبت بودند. پس از بررسی ژن‌های تولیدکننده انتروتوکسیک (*SEA*، *SEB*، *SEC*، *SED*، *SEE* و *SEG*) در بین سه نمونه منجمد آلوده به باکتری استافیلوکوکوس مشاهده شد که تنها در یک نمونه منجمد، ژن انتروتوکسیک *SEA* وجود داشت.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد با توجه به هزینه کم و زمان بسیار کوتاه‌تر مورد نیاز برای شناسایی ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش Multiplex PCR، این روش ابزار قدرتمندی برای مطالعه ژنوتیپ‌های جدایه‌های استافیلوکوک می‌باشد. بنابراین با استفاده از این روش می‌توان به ارتقا سطح سلامت غذایی در جامعه به خوبی پرداخت.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، ژن، ماهی تیلاپیا، Multiplex PCR*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: Dr.h.ahari@Gmail.com

مقدمه

یکی از پایه‌های مهم توسعه اقتصادی در هر کشور، تامین غذای بهداشتی برای افراد جامعه است. در کشورهای پیشرفته، بیشتر بیماری‌های منتقله از طریق غذا به انسان، تحت کنترل متخصصان بهداشتی در آمده است. اما در کشورهای در حال توسعه، مشکلات اقتصادی و بهداشتی ایجاد شده توسط غذا به خصوص غذاهایی که به روش سنتی تولید می‌شوند، هنوز مشاهده می‌گردد (Holah *et al*., 1990). این نوع بیماری یک معضل اساسی برای سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌گردد که سالانه با صرف هزینه‌های چند بیلیون دلاری، باز هم میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا و بخشی دچار مرگ یا بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شوند. امروزه غذاهای دریایی به دلیل بالا بودن ارزش غذایی مورد توجه عموم مردم جهان قرار گرفته و میزان محبوبیت غذاهای دریایی بین مصرف کنندگان در حال افزایش است. محصولات دریایی سرشار از پروتئین هایی است که با تجزیه و شکستن آنها، اسیدآمینه و پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین تشکیل می‌شود. در چنین وضعیتی، شرایط مناسب برای رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* فراهم می‌گردد (Nakano *et al*., 2004; Sanjeev *et al*., 1986). *استافیلوکوکوس ارئوس* یکی از شایع ترین عوامل ایجاد بیماری در اثر مصرف غذاهای دریایی به وسیله انتروتوکسین‌های پیش ساخته شده، در سراسر جهان می‌باشد (Arfatahery *et al*., 2016). مسمومیت غذایی این باکتری به علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذاها و هضم آن ایجاد می‌شود و برخلاف مسیر آرام خود، خسارت‌های فراوانی را به دنبال دارد (Eshraghi *et al*., 2009). *استافیلوکوکوس*[1] یک کوکسی گرم مثبت بوده که به صورت یک باکتری کلونیزه شده بر روی پوست و مخاط انسان و سایر پستانداران یافت می‌شود. این باکتری به راحتی می‌تواند درصد زیادی از نمک و طیف گسترده‌ای از دما و اسیدیته را تحمل کند. همچنین این باکتری باعث بروز مسمومیت غذایی[2]، سپتی سمی[3]، پنومونی[4] یا ذات الریه، عفونت پوستی و سندرم شوک توکسیک[5] می‌شود (Redmond & Griffith, 2003; Normanno *et al*., 2007). *استافیلوکوکوئوس* اورئوس با ایجاد آلودگی در مواد غذایی باعث بروز مسمومیت غذایی می‌شود (Dinges *et al*., 2000)، چراکه طیف وسیعی از ترشحات سمی را تولید می‌کند. به طور کلی ۲۵٪ از این باکتری‌ها انتروتوکسیژنیک می‌باشند (Giannatale *et al*., 2011). انتروتوکسین‌ها دارای اهمیت بسزایی هستند که تقریبا به طور انحصاری توسط سویه‌های کوآگولاز مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شوند و به عنوان عامل استفراغ در مسمومیت غذایی و گاستروآنتریت‌ها مطرح است (Malekzadeh, 2002). هفت کلاس اصلی آنتی‌ژنی از انواع انتروتوکسین‌ها شناسایی شده است که عبارت‌اند از: *SEB, SEA, SEC*$_1$ *SEE, SED, SEC*$_3$, *SEC*$_2$ (Rahimi *et al*., 2012). *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۶۰٪ درصد از افراد جمعیت به صورت متناوب و در ۲۰ تا ۳۰٪ از افراد به صورت ثابت یافت می‌شود. لذا فردی که در مراکز تهیه، عمل آوری و پخش مواد غذایی فعالیت می‌کند در صورت عدم رعایت نکات بهداشتی، می‌تواند باکتری را به غذا منتقل کند (Kluytmans *et al*., 2005). بر اساس گزارش‌های اعلام شده در ۶۸٪ از محصولات دریایی منجمد، ۴۸٪ از غذاهای آماده حاوی ماهی، ۸٪ از ماهی‌ها و صدف‌ها، ۷٪ از میگوها و ۴٪ از سفره ماهی‌ها انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت شده است بنحوی‌که *استافیلوکوکوس ارئوس* یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد بیماری در اثر مصرف غذاهای دریایی به وسیله انتروتوکسین‌های پیش ساخته شده، در سراسر جهان است (Sokari, 1991; Ayulo *et al*., 1994). محصولات دریایی سرشار از پروتئین‌های است که با تجزیه و شکستن آنها، اسیدآمینه و پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین تشکیل می‌شود. که شرایط مناسب برای رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* را فراهم می‌سازد (Dinges *et al*., 2000). ماهی تیلاپیا از جمله آبزیانی است که به دلیل تحمل تغییرات محدوده وسیع زیست محیطی نظیر دما، شوری، اکسیژن محلول، مقاومت به استرس و بیماری، زمان کوتاه تولید نسل جدید، غذا خوردن از سطوح پایین تغذیه‌ای، سهولت در تکثیر و پرورش و بازار پسندی مطلوب آن در بسیاری از نقاط دنیا طرفداران بی‌شماری دارد (El- Sayed, 2006).

[1] Staphylococcus [2] Food poisoning [3] Septicemia [4] Pneumonia
[5] TSS (Toxic shock syndrome)

این ماهی دومین ماهی پرورشی بعد از کپور ماهیان است و بر اساس گزارش‌های موجود، تولید و مصرف این ماهی در جهان در حال افزایش است. به طوری که تولید آن از ۱,۴۷۵ میلیون تن در سال ۲۰۰۲، به ۲,۹۱۷ میلیون در سال ۲۰۰۸ افزایش یافته است (Tamaski *et al*., 2011). بنابراین آلودگی آنها به انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند تعداد قابل زیادی از افراد را با مسمومیت و حتی خطر مرگ همراه سازد. لذا باید ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که باعث ایجاد مسمومیت در ماهی تیلاپیا به عنوان دومین ماهی مورد استفاده در سبد غذایی مردم جهان، شناسایی شود. از جمله مطمئن ترین روشها برای شناسایی ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس در ماهی تیلاپیا، روش واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR است. در این روش نیازی به آنتی‌ژن نبوده و حتی در صورت فقدان یا درصد کمی انتروتوکسین، قابلیت ردیابی ژن‌های مولد آنها ممکن است. این روش بسیار حساس و اختصاصی، جهت سنجش و نیز تکثیر ژن‌های کدکننده انتروتوکسین می‌باشند. از واکنش زنجیره ای پلیمراز در سطح گسترده‌ای برای ردیابی ژن‌های مسئول در انتروتوکسین‌های زیستی بهره می‌گیرند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور تکثیر یک نسخه منفرد یا نسخه‌های کمی از یک قطعه DNA با توالی خاص به کار می‌رود. Arsalan و Ozdemir (۲۰۱۷) به بررسی خصوصیات و شناسایی مولکولی ژن‌های مولد انتروتوکسین و مقاوم به متی سیلین در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از ۱۲۰نمونه گوشت گاو و ماهی (ماهی آب شیرین و آب دریا) پرداختند. آنها پس از جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس به روش‌های بیوشیمیایی و شناسایی ژن‌ها با PCR دریافتند که ۳۰٪ از نمونه‌های گوشت آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده که ۸,۳٪ از جدایه‌ها حامل ژن مولد انتروتوکسین بودند. ۵,۹٪ از جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین، دارای ژن *sea* بودند. علاوه بر این ۲۰٪ ماهی‌های آب شیرین و ۲۷,۵٪ ماهی‌های دریایی، آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند. ۱۲,۵٪ از ماهی‌ها آب شیرین و ۹,۱٪ ماهی آب دریا دارای هر دو ژن *sea* و *sed* بودند. Arfatahery و همکاران (۲۰۱۶) شیوع ژن‌های مولد انتروتوکسین استافیلوکوک و ژن مولد سندرم شوک توکسیک را در محصولات دریایی (ماهی و میگو) در ایران طی سال‌های ۲۰۱۳ و ۲۰۱۴ را با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR ارزیابی کردند. در این مطالعه ۲۰۶ گونه *استافیلوکوکوس ارئوس* از ۶۰۰ نمونه ماهی و میگو بدست آمد که به دلیل حساسیت ضد میکروبی و مقاومت استافیلوکوکوس به متی‌سیلین، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۳۴٪ از نمونه غذاهای آبزی، به باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* آلوده بودند.۶۴٪ از گونه‌های جدا شده، انتروتوکسیک بوده است. شایع‌ترین ژنوتیپ انتروتوکسیک *sea* با ۴۵,۲٪ و سپس ژن *seb* با ۱۸,۵٪ می‌باشد. Ertas Onmaz و همکاران (۲۰۱۴) وقوع و مقاومت آنتی‌میکروبیال *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* را در نمونه‌های ماهی در کشور ترکیه را مورد بررسی قرار دادند. در مجموع ۱۰۰ نمونه ماهی شامل: ۳۰ نمونه ماهی کولی، ۳۵ نمونه ماهی قزل آلا و ۳۵ نمونه ماهی دریایی مورد آنالیز قرار گرفتند. آنها برای تشخیص حضور انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* از روش الایزا و برای تشخیص ژن‌ها کدکننده انتروتوکسین از روش PCR چندگانه استفاده نمودند. ۹٪ از نمونه‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* و ۵٪ آن‌ها به سالمونلا آلوده بودند. نتایج نشان داد که هیچکدام از *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده، انتروتوکسین و ژن کد کننده آن را نداشته‌اند. با توجه آنچه بیان شد، بدلیل مصرف زیاد ماهی تیلاپیلا و خطرات ناشی از مسمومیت‌های ناشی از انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، مطالعه حاضر با اهداف شناسایی ژن‌های مولد انتروتوکسین و بررسی میزان تکرار هر یک از آنها در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های ماهی تیلاپیا تازه و منجمد، بررسی میزان آلودگی نمونه‌های ماهی تیلاپیا، بررسی تفاوت درصد آلودگی استافیلوکوکی و شناسایی ژنی که بیشترین تاثیر را در تولید انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی داراست، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

ماهی‌های خریداری شده از بازار ماهی در سطح شهر جامعه آماری این مطالعه را تشکیل می‌دهند، که بصورت کاملا تصادفی تعداد ۴۲ عدد ماهی تیلاپیلا از بازار ماهی بعثت در شهر تهران برای نمونه آماری خریداری شدند. از این تعداد ۲۱ عدد نمونه ماهی تازه و مابقی نمونه ماهی

منجمد بودند. نمونه‌های تازه در دمای ۴ درجه سلسیوس و نمونه‌های منجمد در دمای ۱۸ درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش در ناقل‌های استریل نگهداری شدند. برای جداسازی استافیلوکوکوس از ماهی ها، روشهای کشت سطحی در محیط برد پارکر[1] و تست کوآگولاز استفاده شد.

- استخراج DNA استافیلوکوکس اورئوس

به‌منظور استخراج DNA ژنومیک مراحل زیر انجام شد. ایزوله‌های بالینی ذخیره‌شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد روی محیط Blood Agar کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس یک کلنی از هر ایزوله کشت داده‌شده به ۵ میلی‌لیتر محیط‌کشت LB Broth (ساخت Merck آلمان) که قبلاً درون لوله‌های درب دار شیشه‌ای به تعداد ایزوله‌ها تقسیم و شماری گذاری شده بودند، تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن زمان موردنظر (۲۰ ساعت)، لوله‌ها از انکوباتور خارج شد. ۱/۵ سی سی از محیط کشت حاصل، درون میکروتیوب های درب دار ۱/۵ پلاستیکی ریخته و مراحل استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شرکت آزما اکسیر پژوه بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. برای تأیید کار و کیفیت‌سنجی DNAهای استخراج‌شده، ابتدا با رقت سازی DNAهای استخراج‌شده، OD آن‌ها مورد خوانش قرار گرفت. همچنین محصولات DNA به میزان ۵ لاندا بعد از ترکیب با Loading dye روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. DNA های حاصل تا زمان انجام آزمایش PCR در دمای ۲۰- ذخیره‌سازی شدند. بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده با الکتروفورز و روش نانودراپ انجام شد.

- آماده‌سازی پرایمرها و انجام PCR با DNA استخراج شده

برای شناسایی ژن‌های مورد نظر از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد. همه پرایمرها که از شرکت متابیون آلمان خریداری شده بودند، بعد از اضافه کردن آب مقطر لیوفیلیزه (با توجه به حجم تعیین‌شده توسط شرکت سازنده پرایمر)، رقت اولیه ۱۰۰ پیکومولار تهیه و سپس از پرایمرها به‌صورت جداگانه رقت ۱۵ پیکومولار برای PCR با استفاده از DNA استخراج‌شده توسط ژل آگاروز یک درصد تهیه شد.

- انجام PCR

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و با مخلوط واکنش حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۲/۵ میکرولیتر(مولار میلی ۴) $MgCl_2$، یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۰/۲میکرومول dNTPs، ۳۰-۲۰ پیکومول از هر پرایمر آغازگر و ۲ میکرولیتر DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

جدول ۱- پرایمرهای به کار رفته به منظور شناسایی ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

Table 1- Primers used to identify *Staphylococcus aureus* genes

Primer	Gen	Primer sequence	Temperature	Product length
SEA F	*enterotoxin A gene*	AAGTCTGAATTGCAGGGAACA	57.77	252 bp
SEA R		ACCCGCACATTGATAACCATAA	58.11	
SEB F	*enterotoxin B gene*	TGGTGGTGTAACTGAGCATAAT	57.43	344 bp
SEB R		TCCTCACATCTTTCGACTCAATC	58.25	
SEC F	*enterotoxin C gene*	CAGACCCTATGCCAGATGATTT	57.90	368 bp
SEC R		CCCATTATCAAAGTGGTTTCCTTC	58.03	
SED F	*Staphylococcus aureus enterotoxin D*	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	48.52	318 bp
SED R		TAATGCTATATCTTATAGGG	45.58	
SEE F	*Staphylococcus aureus enterotoxin E*	GCTGGAGGCACACCAAATA	57.74	301 bp
SEE R		CATAACTTACCGTGGACCCTTC	58.47	
SEG F	*Staphylococcus aureus enterotoxin G*	GCTGGAGGCACACCAAATA	57.97	410 bp
SEG R		CATAACTTACCGTGGACCCTTC	58.06	
16S PCR F		TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	71.56	580-590 bp
16S PCR R		ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGC	72.66	

[1] Baird Parker Agar

برنامه اجرای چرخه‌های PCR واجد مراحل زیر بود: واسرشتگی (denaturation) اولیه، چرخه تکثیر شامل واسرشتگی، اتصال پرایمرها به DNA الگو (annealing) و در نهایت طویل شدن رشته الگو (extension). طویل شدن نهایی (extension final) بعد از طویل شدن رشته الگو صورت پذیرفت (جدول ۲). لازم به ذکر است که برنامه PCR در دستگاه ترموسایکلر برای هر ژن متفاوت بود. سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولیدکننده انتروتوکسین که در این تحقیق به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند شامل *SEB* + ATCC14458: *SEA*، +D4508: *SED* + NCTC 9393: و +AB80002: *SEC*.

در نهایت، نمونه ای که دارای کیفیت مناسبی بود برای سکوئنسینگ انتخاب و توالی‌یابی شد سپس توالی نوکلئوتیدی حاصله با استفاده از برنامه BioEdit به توالی پپتیدی ترجمه شد و در NCBI GenBank™ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ثبت شد.

- شناسایی توالی یابی DNA

در پژوهش حاضر، توالی یابی DNA به صورت اتوماتیک و با استفاده از دستگاه توالی یاب Applied Biosystems 3500 (ABI) (HITACHI) انجام گرفت. سیستم توالی یاب بر مبنای فلورسانس ABI، نوع پیشرفته و اصلاح شده ای از توالی یابی دی داکسی سنگر است.

جدول ۲- برنامه چرخه PCR برای ژنهای مورد بررسی

Table 2- PCR cycle program for the studied genes

Gene	MW (bp)	PCR Steps	Temperature	Time	Cycle
SEA	252	Denaturation Primary	95	min 5	1
		Denaturation	95	10 s	35
		Annealing	62	10 s	
		Extension	72	10 s	
		Final Extension	72	2 min	1
SEB	344	Primary Denaturation	95	5 min	1
		Denaturation	95	30 s	35
		Annealing	59	15 s	
		Extension	75	15 s	
		Final Extension	75	5 min	1
SEC	368	Primary Denaturation	95	5 min	1
		Denaturation	95	15 s	35
		Annealing	61	15 s	
		Extension	74	15 s	
		Final Extension	72	5 min	1
SED	318	Primary Denaturation	95	5 min	1
		Denaturation	95	15 s	35
		Annealing	52	15 s	
		Extension	74	15 s	
		Final Extension	72	5 min	1
SEE	301	Primary Denaturation	95	5 min	1
		Denaturation	95	10 s	35
		Annealing	59	10 s	
		Extension	75	10 s	
		Final Extension	75	2 min	1
SEG	410	Primary Denaturation	95	5 min	1
		Denaturation	95	30 s	35
		Annealing	58	15 s	
		Extension	75	30 s	
		Final Extension	75	5 min	1
16S PCR	580	Primary Denaturation	95	5 min	1
		Denaturation	95	30 s	35
		Annealing	68	30 s	
		Extension	74	60 s	
		Final Extension	72	5 min	1

یافته‌ها

- بررسی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

طبق نتایج به دست آمده از بررسی وجود باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد، در مجموع، سه نمونه از میان نمونه‌های منجمدِ جمع‌آوری شده آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و نمونه‌های تازه به استاف اورئوس آلوده نبودند. به طور کلی، ۹۲/۹ درصد از کل نمونه‌های مورد بررسی فاقد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند و ۷/۱ درصد از کل نمونه‌ها آلوده به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* شدند.

- بررسی تست کوآگولاز

از تست کوآگولاز برای تمایز *استافیلوکوکوس اورئوس* (کوآگولاز مثبت) از استافیلوکوک‌های کوآگولاز منفی استفاده شد. کوآگولاز آنزیمی است که توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید می‌شود و فیبرینوژن (محلول) موجود در پلاسما را به فیبرین (نامحلول) تبدیل می‌کند. نتایج بررسی تست کوآگولاز در پژوهش حاضر نشان داد، هر سه نمونه ماهی منجمد مورد بررسی، کوآگولاز مثبت بودند.

- بررسی کمی و کیفی DNA

با توجه به شکل ۱ بررسی کیفی DNA استخراج شده با الکتروفورز انجام شد، همچنین بررسی کمی DNA به روش نانودراپ انجام شد. طبق نتایج به دست آمده DNA استخراج شده از کیفیت مطلوبی برخوردار بود.

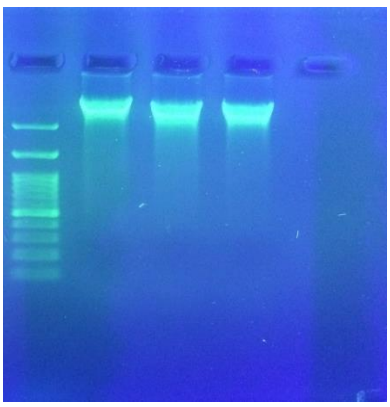

Figure 1- The qualitative examination of DNA extracted using the electrophoresis

شکل ۱- بررسی کیفی DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز

- شناسایی ژن‌های انتروتوکسیک در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس

استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبتی است که در شرایط خاص توانایی ایجاد بیماری‌های مختلف را دارد. این باکتری با ترشح سموم مختلف از جمله انتروتوکسین شرایط تهاجم به میزبان را فراهم می‌آورد. همان طور که در جدول ۳، مشاهده می‌شود، ژن *16s St. aureus* در هر سه نمونه آلوده یافت شد. پس از بررسی ژن‌های تولید کننده انتروتوکسیک (*SEA*، *SEB*، *SEC*، *SED*، *SEE* و *SEG*) در بین سه نمونه منجمد آلوده به باکتری استافیلوکوکوس (13c، 14c و 16c) مشاهده شد، تنها در یک نمونه ی منجمد یعنی نمونه 13c، ژن انتروتوکسیک *SEA* وجود داشت. ژن *SEC* شناسایی شده برای توالی‌یابی و دریافت سکانس ژنی از کیفیت مناسبی برخوردار نبود.

جدول ۳- نتایج بررسی ژن‌ها یافت شده در نمونه‌های آلوده ماهی تیلاپیا

Table 3- Results of genes detected in infected samples of tilapia

Sample/Genes	16c	14c	13c
16s St. aureus	+	+	+
SEA	-	-	+++
SEB	-	-	-
SEC	-	-	+
SED	-	-	-
SEE	-	-	-
SEG	-	-	-

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، تصویر باند مربوط به ژن *16s St. aureus* بر روی ژل الکتروفورز در هر سه نمونه و نمونه کنترل مثبت باند مربوطه تشکیل شده است.

با توجه به شکل ۳، بررسی تصویر باند مربوط به ژن *SEA* نشان داد، این ژن تنها در نمونه 13c باند تشکیل داده است و از کیفیت مناسبی برای توالی یابی برخوردار می‌باشد. این ژن پس از بررسی کیفی، برای توالی یابی منتقل شد، با این حال قبل از توالی یابی استخراج از روی ژن نیز صورت گرفت.

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، بررسی تصویر باند مربوط به ژن *SEB* نشان داد، باند مربوطه برای هیچ کدام از نمونه‌ها ظاهر نشده است.

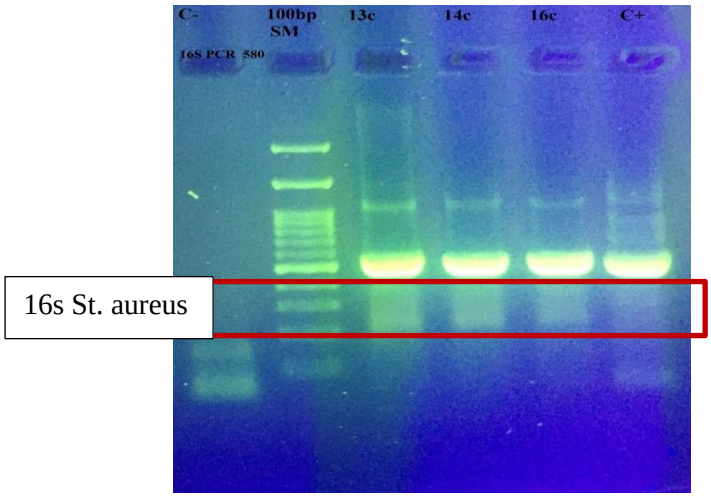

Figure 2- Band image of the *16s St. Aureus* on gel electrophoresis

شکل ۲- تصویر باند مربوط به ژن *16s St. aureus* روی ژل الکتروفورز

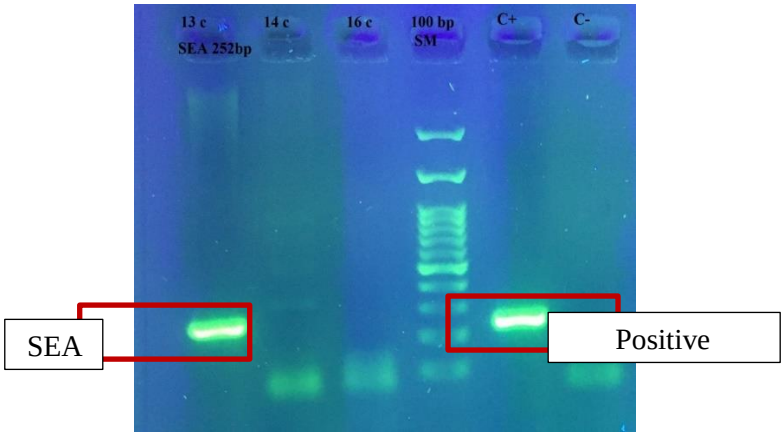

Figure 3- Band image of *SEA* gene on gel electrophoresis

شکل ۳- تصویر باند مربوط به ژن *SEA* روی ژل الکتروفورز

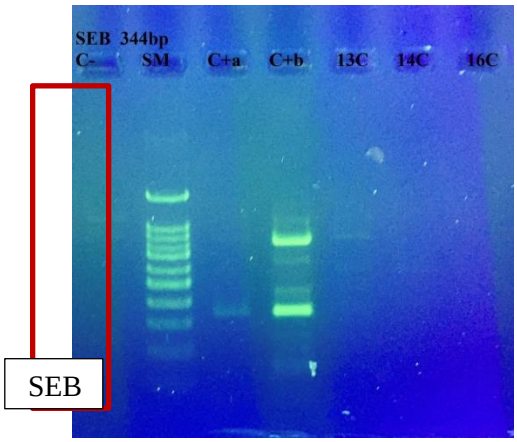

Figure 4- Band image of *SEB* gene on gel electrophoresis

شکل ٤- تصویر باند مربوط به ژن *SEB* روی ژل الکتروفورز

با توجه به شکل ۵، همانطور که مشاهده می‌شود، باند مربوط به ژن *SEC* تنها برای نمونه 13c و نمونه کنترل مثبت ظاهر شده است اما از کیفیت مناسبی برخوردار نمی‌باشد و بنابراین برای توالی یابی مناسب نبود.

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، بررسی تصویر باند مربوط به ژن *SED* نشان داد، باند مربوطه برای هیچ کدام از نمونه‌ها ظاهر نشده است.

با توجه به شکل ۷، بررسی تصویر باند مربوط به ژن *SEE* نیز نشان داد، باند مربوطه برای هیچ کدام از نمونه‌ها ظاهر نشده است.

در نهایت با بررسی ژن *SEG* همانطور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، باند مربوطه برای هیچ کدام از نمونه‌ها ظاهر نشده است.

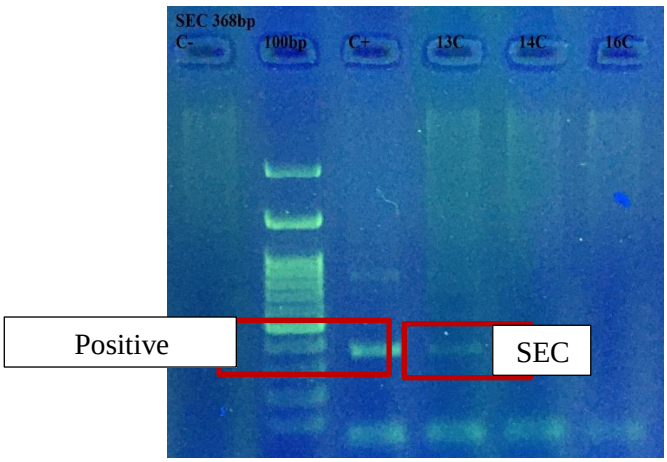

Figure 5- Band image of *SEC* gene on gel electrophoresis

شکل ۵- تصویر باند مربوط به ژن *SEC* روی ژل الکتروفورز

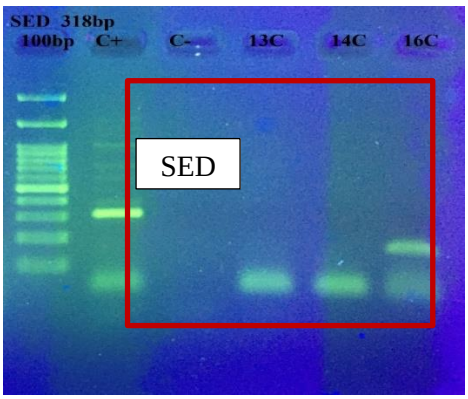

Figure 6- Band image of *SED* gene on gel electrophoresis

شکل ٦- تصویر باند مربوط به ژن *SED* روی ژل الکتروفورز

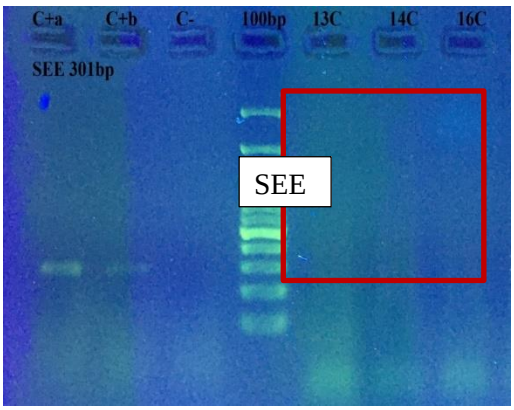

Figure 7- Band image of *SEE* gene on gel electrophoresis

شکل ۷- تصویر باند مربوط به ژن *SEE* روی ژل الکتروفورز

- **توالی‌یابی DNA به صورت اتوماتیک و با دستگاه توالی‌یاب[1]**

سیستم توالی یاب بر مبنای فلورسانس ABI، نوع پیشرفته و اصلاح شده ای از توالی یابی دی داکسی سنگر است. در شکل 9 و 10 توالی به دست آمده برای ژن *SEA* قابل مشاهده می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده در جدول 4، توالی نوکلئوتیدی بلاست شده به دست آمد.

از آنجایی که ژن به صورت پروتئینی به شکل فعال برای ایجاد مسمومیت و بیماری تبدیل خواهد شد، توالی نوکلئوتید به توالی پپتیدی طبق جدول ۵ تبدیل شد.

بحث

بر اساس نتایج بدست امده در این تحقیق در نمونه‌های ماهی تیلاپیا خریداری شده از بازار ماهی در سطح شهر مشخص شد که سه نمونه از ماهی‌های مورد مطالعه آلوده به استاف اورئوس بوده که سه ژن توکسین‌زای *16s St. aureus* در هر سه نمونه آلوده یافت شد. در بین ژن‌های دیگر توکسین‌زا تنها *SEA* شناسایی شد. مسمومیت غذایی این باکتری که به علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذاها می‌باشد، خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای ایجاد می‌نماید. انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* *SE* ها عوامل ایجادکننده مسمومیت غذایی هستند و شامل گروهی از پروتئین‌های کروی با زنجیره ساده به وزن مولکولی ۲۸۰۰۰ تا ۳۵۰۰۰ می‌باشند (Adibfar, 2004). آن‌ها اگزوتوکسین‌های معدی- روده‌ای قوی می‌باشند که در طول فاز لگاریتمی رشد یا در طول گذر به فاز سکون سنتز می‌گردند. انتروتوکسین‌ها ابر آنتی‌ژن‌هایی هستند، که به مولکول‌های MHC کلاس II پیوند یافته و سبب تحریک سلول‌های T می‌شوند (Jawetz *et al*., 2008). از آنجا که این انتروتوکسین‌ها تحت شرایط دمایی، pH پایین و آنزیم‌های پروتئولیتیک مقاوم می‌باشند، طی فرایند هضم در معده فعال باقی می‌مانند (Argudín *et .al*., 2010) هفت کلاس اصلی آنتی‌ژنی از انواع انتروتوکسین‌ها شامل: *SEA*، *SEB*، *SEC1*، *SEE* تاکنون شناسایی شده است (Rahimi *et al*., 2012). ژن‌های کدکننده *SE*ها پشتبان‌های ژنتیکی متفاوتی از قبیل *sea* (پروفاژ)، *seb* (کروموزوم، پلاسمید، ترانسپوزون)، *sec1* (پلاسمید)، *sec2,3* (جزایر بیماری‌زایی)، *sed* (پلاسمید)، *see* (فاژ ناقص) داشته که غالبا عناصر ژنتیکی متحرک می‌باشند (Loir *et al*., 2003).

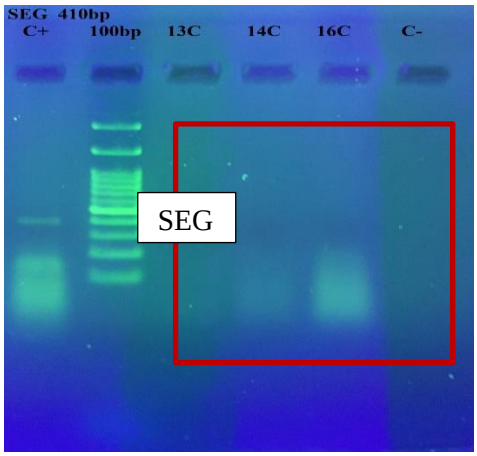

Figure 8- Band image of *SEG* gene on gel electrophoresis

شکل ۸- تصویر باند مربوط به ژن *SEG* روی ژل الکتروفورز

جدول ٤- توالی نوکلئوتیدی ژن *SEA*

Table 4- Nucleotide sequence of *SEA* gene[1]

Gen	Nucleotide sequence
SEA	AATCTATTATTACAATGAAAAAGCTAAAACTGAAAATAAAGAGAGTCACGATCAA TTTTTACAGCATACTATATTGTTTAAAGGCTTTTTTACAAATCATTCATGGTATAAC GATTTATTAGTAGATTTTGATTCAAAGGATATTGTTGATAAATATAAAGGG

[1] Applied Biosystems (ABI)

جدول ۵- توالی پروتئینی ژن *SEA*

Table 5- *SEA* Gene Protein Sequence

Gen	Protein Sequence(EMBOSS_001_2<)
SEA	IYYYNEKAKTENKESHDQFLQHTILFKGFFTNHSWYNDLLVDFDSKDIVDKYKG

Figure 9- DNA sequencing of the *SEA* gene

شکل ۹- توالی یابی DNA ژن*SEA*

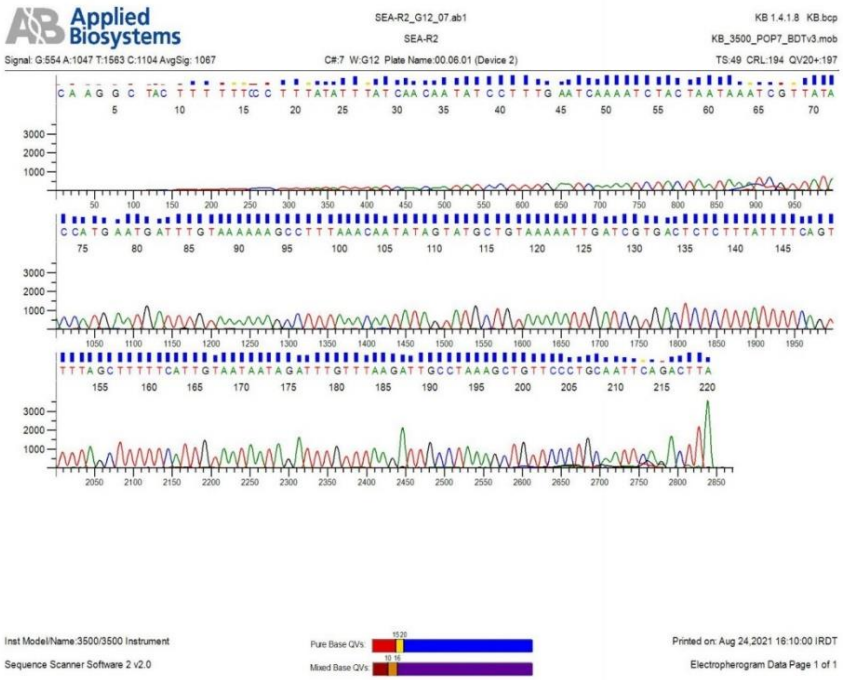

Figure 10- DNA sequencing of the *SEA* gene

شکل۱۰- توالی یابیDNA ژن *SEA*

SEA رایج‌ترین توکسینی است، که در شیوع مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی وجود دارد. مقدار *SEA* لازم برای ایجاد مسمومیت متغیر می‌باشد، به‌طوری‌که مقدار لازم برای ایجاد عمل استفراغ ۲۰ تا ۰/۲ میکروگرم است (Pepe *et al*., .2006) با شناخت میزان شیوع این باکتری در مواد غذایی می‌توان اولا منبع عفونت را شناسایی نمود و سپس با کمک گرفتن از روش‌های استاندارد، آلودگی این قبیل مواد غذایی را به حداقل رساند. این دقیقاً هدفی بود که در این مطالعه مد نظر قرار گرفت.

امروزه بر اساس آمارهای سازمان‌های جهانی همچون FAO، صنعت آبزیپروری در سراسر جهان در حال گسترش روزافزون است، این توسعه سریع، تأثیرات متعددی بر وضعیت اکولوژی، سلامت بشر و اقتصاد جوامع داشته است. در این میان، ماهی به دلیل خصوصیات مثبت از جمله امکان سازگاری با محیط جدید، تولید مثل سریع و رشد مناسب در بیش از ۱۰۰ کشور جهان به عنوان ماهی پرورشی پذیرفته شده است. در حال حاضر مشخص شده است که طیف گستردهای از عوامل بیماری‌زا در رده های مختلف سنی، میتوانند ماهی تیلاپیا را مبتلا ساخته و سبب بروز تلفات گسترده شوند. در این میان عوامل باکتریائی بیشترین سهم را در ایجاد بیماری داشته و بعد از آن بیماری‌های انگلی و سپس بیماری‌های ویروسی قرار دارند. نکته قابل توجه رابطه همکاری میان عوامل بیماری زای انگلی و بروز بیماری‌های باکتریائی در این گونه میباشد به نحوی که عوامل انگلی با تهاجم به ماهی میزبان به عنوان زمینه ساز بیماری‌های باکتریائی که معمولا به صورت ساپروفیت و فرصت طلب در محل حضور دارند عمل نموده و موجب بروز بیماری‌های سپتی سمیک گسترده میشوند. در واقع رابطه هم افزائی[1] انگل و باکتری موجب بروز عوارض وخیم‌تر و تلفات شدیدتری در ماهیان تیلاپیای مبتلا می‌گردد.

در مطالعه‌ای که بر روی میزان شیوع ژن انتروتوکسین‌های معمول در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز به روش Multiplex PCR انجام گرفته، نتایج حاصل نشان داده که از ۷۵ نمونه باکتریایی یک جدایه واجد انتروتوکسین‌های *SEB* و *SEC*، سه جدایه واجد انتروتوکسین *SEC* بودند و ژن مربوط به انتروتوکسین *A* در هیچ کدام از جدایه‌ها شناسایی نگردیده است (Esna Ashari *et al*., 2012) که این مطالعات با تحقیق صورت گرفته همسو می‌باشند.

در یک مطالعه در ایتالیا که توسط Fiorino و Colleagues در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت، ثابت شد که ۴۵/۲٪ از گونه‌های جدا شده از محصولات گوشتی انتروتوکسین تولید می‌کنند. که فراوانی آن‌ها به ترتیب شامل انتروتوکسین *C* ۵۱/۵٪، انتروتوکسین *A* ۳۰/۳٪ و با گستردگی کمتر *SEB* و *SED* قرار داشتند (Giannatale *et al*., 2011).

گزارش شده است که انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی کلاسیک (*SEA-SEE*) باعث ۹۵ درصد مسمومیت‌های غذایی با استافیلوکوک می‌شوند. در میان آنها، *SEA* شایع ترین در موارد مسمومیت غذایی مرتبط با استافیلوکوک است. در مطالعه ای که توسط سانچز و همکاران انجام شد. در اسپانیا ۳۱، سویه‌های جدا شده از ۲۳،۵ درصد نمونه‌ها انتروتوکسیژنیک بودند. نسبت کمتری از *SEs* و سویه‌های *tsst-1* مثبت قبلاً در بین جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از محصولات شیلات در سایر مناطق جغرافیایی ۳،۱۰،۲۵ یافت شد. ژنوتیپ فقط دریا و ژنوتیپ دریا در ترکیب با سایر ژن‌ها شایع ترین ژنوتیپ‌ها در ژاپن (۸۰ تا ۹۰ درصد) و در ایالات متحده (۵۰ درصد) ۴۰،۴۱ هستند. در سال ۲۰۱۱، شیوع گاستروانتریت در باشگاه ورزشی بارسلون اسپانیا مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که ۹۱ نفر از طریق بلع ماهی آلوده به این بیماری مبتلا شده بودند. سویه‌های عفونی *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌های نوع *A* و *D28* را تولید کردند.

در یک مطالعه که به وسیله Normano و همکاران (۲۰۰۵) ۲۳/۱٪ از محصولات گوشتی تازه و آماده بازار در ایتالیا به‌وسیله استافیلوکوکوس اورئوس‌های انتروتوکسیژنیک آلوده بودند. که قسمت عمده *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* انتروتوکسیژنیک جدا شده *SEA* و *SEC* تولید می‌کرده‌اند. در تحقیقی دیگر که توسط Pelisser و همکاران (۲۰۰۹) بر روی شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و شناسایی ژن‌های انتروتوکسین در محصولات گوشتی صورت گرفته؛ آن‌ها توانستند ثابت

[1] Synergism

کنند که از مجموع ۱۰۲ نمونه گوشت آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۹۱ مورد ژن *femA*، ۱۰ مورد ژن *sea*، ۱۲ مورد ژن *sed* و ۴ مورد ژن *see* را دارا می‌باشند. در تحقیقی که بر روی پروفایل‌های ژن انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* و دیگر استافیلوکوک‌ها جدا شده از غذاهای گوناگون صورت گرفت؛ از مجموع ۷۰ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده در ۲ نمونه گوشت مرغ (۲/۹٪) ژن *sea* شناسایی شد (Gencay *et al*., 2010). که این مطالعات با تحقیق حاضر همسو نمی‌باشند. بدین جهت عفونت‌های منتقله از راه غذا و مسمومیت‌های غذایی، نگرانی بسیار مهمی برای دولت‌ها و صاحبان صنایع غذایی در چند دهه اخیر بوده است. در هر حال میزان آلودگی مواد غذایی به استافیلوکوکوس اورئوس در کشور ما نسبتا قابل ملاحظه می‌باشد (Eshraghi *et al*., 2009). از طرفی افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در ایران جمعیت‌نسبتا زیادی را به خود اختصاص می‌دهند. این موضوع با در نظر گرفتن میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا ۶۰–۵۰٪ در ناحیه نازوفارنکس و ۳۰–۵٪ در پوست و مو می‌رسد، به خصوص از ناحیه مسئولین تهیه غذاها پر رنگتر می‌شود (Eshraghi *et al*., 2009) همچنین آگاهی جامعه از میزان شیوع باکتری و انتروتوکسین‌های تولید شده توسط آن از ابتلا افراد به بیمارهای گوارشی می‌کاهد.

در مطالعه مشابهی که با محصولات آبی در هند انجام شد، میزان آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۷ درصد بود مشابه یافته‌های ما است. سایر محققین میزان کمتری از *استافیلوکوکوس اورئوس* را نسبت به نتایج ما گزارش کرده‌اند (۸،۱۶،۲۸،۲۹). مطالعه‌ای که محصولات دریایی را در برزیل بررسی می‌کرد، میزان بالایی از آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۰،۱۴) را گزارش کرد. یکی از دلایل اصلی تغییرات در این نتایج ممکن است تاثیر آلودگی محیطی و همچنین تفاوت در فرآوری محصولات شیلات به دلیل نگهداری باشد.

نتیجه‌گیری

استفاده از Multiplex PCR برای مشخص کردن سویه‌های استافیلوکوک و مقاومت آنها در برابر متی سیلین به خوبی مستند شده است. این گزارش‌ها بر روی تشخیص ژن مسئول مقاومت به متی سیلین (*mecA*) به همراه ژن *femA*، *16S rRNA*، *nuc* یا *IS431* به عنوان یک کنترل(های) مثبت تمرکز دارند. یک مطالعه اخیر استفاده از دو روش Multiplex PCR را برای تشخیص ژن‌های اگزوتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* توصیف می‌کند: یکی برای شناسایی ژن‌های انتروتوکسین و دیگری برای شناسایی ژن‌های *tst*، *eta* و *etb* طراحی شده است. بکر و همکاران با استفاده از پروب‌های الیگونوکلئوتیدی که از توالی ژن‌های سم *استافیلوکوکوس اورئوس* مشتق شده اند، از روش ایمونواسی آنزیم DNA برای تایید ویژگی محصولات PCR استفاده کرده اند.

با توجه به هزینه کم و زمان بسیار کوتاه‌تر مورد نیاز برای شناسایی ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش Multiplex PCR، ما معتقدیم که این ابزار قدرتمندی برای مطالعه ژنوتیپ‌های جدایه‌های استافیلوکوک است. این روش به طور ویژه برای تناسب با الگوی کار روزانه یک آزمایشگاه بالینی معمول توسعه یافته است، زیرا تشخیص ژنوتیپی مقاومت دارویی و حضور ژن‌های سم در حال تبدیل شدن به یک جزء مهم از موجودی تشخیصی چنین آزمایشگاه‌هایی است. بنابراین با استفاده از این روش به ارتقا سلامت غذایی در جامعه بپردازیم.

منابع

Arfatahery, N., Davoodabadi, A. & Abedimohtaseb, T. (2016). Characterization of toxin Genes and antimicrobial susceptibility of staphylococcus aureus isolates in fishery products in iran. Science Reports, 6, 34216,1-7.

Ayulo, A.M.R., Machado, R.A. & Scussel, V.M. (1994). Enterotoxigenic Escherichia coli and Staphylococcus aureus in fish and seafood from the southern region of Brazil. International Journal of Food Microbiology, 24(1-2), 171-178.

Arslan, S. & Ò zdemir, F. (2017). Molecular characterization and detection of enterotoxins, methicillin resistance genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus* aureus from fish and ground beef. Polish Journal of Veterinary, 20, 1, 85-94.

Argudín, M.Á., Mendoza, M.C. & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins, 2(7), 1751-1773.

Adib Far, P. (2014). Medical Microbiology. Noor Danesh Publications, 63-74. [In Persian]

Azizkhani, M. & Turian, F. (2019). Evaluation of the frequency of Staphylococcus aureus enterotoxinogenic genes isolated from minced meat samples in foodstores in Mazandaran province. Journal of Veterinary Research, 74 (1), 65-72. [In Persian]

Asgarpour, D. & Zeyghami, H. (2015). The role of Staphylococcus aureus enterotoxins (SEs) in staphylococcal food poisoning: A systematic review article. Quarterly Journal of Laboratory and Diagnosis, 28, 63-73. [In Persian]

Dinges, M.M., Orwin, P.M. Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology Reviews, 13(1), 16-34.

Ertas Onmaz, N., Abay, S., Karadal, F., Hizlisoy, H., Telli, N. & Al, S. (2014). Occurrence and antimicrobial resistance of staphylococcus aureus and salmonella spp in retail fish sample in turkey. Marine Pollution Bulletin (Elsevier), 1-5.

El-Sayed, A.F.M. (2006). Tilapia culture in salt water: environmental requirements, nutritional implications and economic potentials. Avances en Nutricion Acuicola.

Giannatale, E.D., Prencipe, V., Tonelli, A. & Marfoglia, C. (2011). Characterization of Staphylococcus aureus trains isolated from food human consumption. Veterinaria Italiana, 47(2), 165- 173.

Gencay, Y.E., Ayaz, N.D. & Dogru, A.K. (2010). Enterotoxin Gene Profiles of Staphylococcus aureus and Other Staphylococcal Isolates from Various Foods and Food Ingredients. Journal of Faculty of Veterinary Medicine Erciyes University, 7(2), 75-80.

Holah, J.T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D. & Spenceley, H. (1990). A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. Letters in Applied Microbiology, 11(5), 255-259.

Jawetz, E., Melnik, J. L., Adelberg, E., Brooks, G., Bottle, J. & Stephen, M. (2008) Medical Microbiology. Translated by: Rahimi, Mohammad Karim Vatahri, Amid, Ayizh Publications, Tehran, Iran, 269. [In Persian].

Ishraqi, S., Salehipour, Z., Pourmand, M.R., Rahimi Darushani, A., Salehi, Z., Taghi, M. & Aghamiri, S. (2009). Evaluation of frequency distribution of tst gene with entC, ent A, ent A/C genes in Staphylococcus aureus isolates isolated from different food products. Journal of Tehran University of Medical Sciences, 67(7), 470-476. [In Persian]

Isna-ashari, M., Shayeq, J. & Nasrollahi, I. (2012). A study on prevalence of common enterotoxin genes of Staphylococcus aureus isolated from buffalo milk in Tabriz province using Multiplex PCR. Journal of Food Hygiene in Tabriz, 2, (2), 61-68. [In Persian]

Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R. & Inamoto, T. (2005). Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus and enterotoxigenic Staphylococcus aureus in retail raw chicken meat throughout Japan. Journal of Veterinary Medical Science, 67(3), 269-274.

Kluytmans, J.A.J.W. & Wertheim, H.F.L. (2005). Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. Infection, 33(1), 3-8.

Loir, Y.L., Baron, F. & Guatier, M. (2003). Staphylococcus aureus and food poisoning. Genetics and Molecular Research, 2(1), 63-76.

Nakane, A. (2010). Protective effect of glutathione Stransferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against Staphylococcus aureus-induced bovine mastitis. Vet Immunol Immunopathology, 135, 64-70.

Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisetti, E. & Celano, G.V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology, 115(3), 290-296.

Pelisser, M.R., Klein, C.S., Ascoli, K.R., Zotti, T.R. & Arisi, A.C.M. (2009). Ocurrence of Staphylococcus aureus and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. Brazilian Journal of Microbiology, 40(1), 145-148.

Pepe, O., Blaiotta, G., Bucci, F., Anastasio, M., Aponte, M. & Villani, F. (2006). Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process. Applied and Environmental Microbiology, 72(11), 7057–7062.

Redmond, E.C. & Griffith, C.J. (2003). Consumer food handling in the home: a review

of food safety studies. Journal of food protection, 66(1), 130-161.

Rahimi, E., Mommtaz, H., Shakerian, A. & Kavyani, H.R. (2012). The detection of classical enterotoxins of Staphylococcus aureus in raw cow milk using the ELISA method. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 36(3), 319-322.

Sanjeev, S. (2003). Bacteria of public health significance in seafood.

Sokari, T. (1991). Distribution of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in ready-to-eat foods in eastern Nigeria. International Journal of Food Microbiology, 12(2-3), 275-279.

Tamasoki, M. S., Pahlavani, S., Pouria, M. & Shah Mahmoudi, S. (2011). Overview of tilapia breeding in the world, Regional Symposium on Applied Fisheries and Environmental Studies, Kermanshah, https://civilica.com/doc/159702. [In Persian]

Registration and Identification of Toxic *S. aureus* genes Isolated from Tilapia Fish Using Multiplex PCR Technique

N. Nia Khalili[a], H. Ahari [b*], B. Nowruzi[c]

[a] M. Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b*] Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Assistant Professor of the Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 21 July 2022 Accepted: 19 September 2022

Abstract

Introduction: Aquatic animal products are considered very important food items in the food basket regarding their high calorie, protein, and omega-3 unsaturated fat. Many aquatic animals, including fish, may always be infected with pathogenic microorganisms at various stages, from hunting to purchasing. Eventually, these factors would cause severe poisoning in humans. The present study investigates the registration and identification of *Staphylococcus aureus's* toxic genes isolated from tilapia using the Multiplex PCR technique.

Materials and Methods: The sample size included 42 subjects (21 fresh fish samples and 21 frozen fish samples). First, after preparing the samples, *Staphylococcus aureus* was isolated and examined as surface culture in Baird-Parker medium. Next, a Coagulase test was performed, and the enterotoxin gene was identified by DNA extraction. Finally, gene sequencing was carried out automatically and systematically.

Results: The results suggested that 92.9% of the total samples (21 fresh tilapia and 18 frozen fish) had no *Staphylococcus aureus*, and 7.1% of the samples were infected with *Staphylococcus aureus*. The coagulase test results also suggested that all three frozen fish samples were coagulase positive. Examining enterotoxin-producing genes (*SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED*, *SEE*, and *SEG*) among three frozen samples infected with Staphylococcus bacteria revealed *SEA* enterotoxin gene only in one frozen sample.

Conclusion: The results showed that due to the low cost and much shorter time required to identify toxic Staphylococcus aureus genes using Multiplex PCR, this method is highly effective in studying the genotypes of Staphylococcus isolates. Therefore, by using this method, one can improve the food health level in the society.

***Keywords*:** *Gene, Multiplex PCR, Staphylococcus aureus, Tilapia.*

* Corresponding Author: Dr.h.ahari@Gmail.com