پراکندگی ژن انتروتوکسین A در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از پنیر سفید سنتی آب نمکی

خسرو محمدی *

چکیده

مصرف مواد غذایی حاوی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، اغلب موجب مسمومیت غذائی می شوند. انتروتوکسین A شایع‌ترین سم در مسمومیت‌های استافیلوکوکی شناخته شده است. هدف از این مطالعه تعیین میزان آلودگی پنیرهای سفید آب نمکی تهیه شده به روش سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* و شناسایی ژن کد کننده انتروتوکسین A (*sea*) بود. در مجموع تعداد ۱۲۰ نمونه پنیر آزمایش شدند که از این تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱۱ (۹/۱٪) نمونه جداسازی شد. نتایج شمارش در محدوده cfu/g $۱۰^{۱}$ × ۱/۵ تا $۱۰^{٤}$ × ۸/٦ متغیر بود. هیچ‌کدام از نمونه‌ها از نظر شاخص مسمومیت با *استافیلوکوکوس اورئوس* در حد بحرانی (cfu/g $۱۰^{٥}$<) نبود. از هر نمونه پنیر پنج کلونی مشکوک با آزمایش‌های بیوشیمیایی تأیید شدند. شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطح گونه براساس ژن 23S rRNA، ژن ترمونوکلئاز و ژن انتروتوکسین A به روش PCR چندگانه ارزیابی شدند. در مجموع ۵۵ جدایه مورد مطالعه قرار گرفتند. همه جدایه‌ها بعنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید شدند. ژن انتروتوکسین A (*sea*) در ٦ (۱۰/۹٪) جدایه مشاهده شد. طبق نتایج این مطالعه ژن *sea* در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* پنیر سفید سنتی آب نمکی وجود دارد و درصورتیکه شرایط مساعد برای رشد و تولید انتروتوکسین فراهم شود می‌تواند بعنوان یک مخاطره بالقوه مطرح شود.

واژگان کلیدی: *پنیر سفید سنتی آب نمکی، استافیلوکوکوس اورئوس، ژن، انتروتوکسین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه*

تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۲۸

مقدمه

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی از مهمترین مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌آید بطوریکه در بسیاری از کشورها این باکتری بعنوان دومین یا سومین عامل بروز بیماری‌های غذایی بعد از *سالمونلا* و *کلستریدیوم پرفرینجنس* شناخته شده است. از مجموع ۲٤ میلیون مورد مسمومیت غذایی گزارش شده در کشور آمریکا ۹ میلیون مورد آن مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده که بیش از یک سوم موارد کل مسمومیت‌های غذایی در این کشور می‌باشد(٤).

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در اثر بلع سم تولید شده از بعضی سویه‌ها در مواد غذایی می‌باشد که به علت ایجاد تورم یا التهاب معده‌ای ـ روده‌ای، انتروتوکسین نامیده می‌شود (۱۲). ۹۵٪ مسمومیت‌های ناشی از انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* با تایپ‌های A، B، C، D و E بوده و ۵٪ باقی مانده توسط دیگر تایپ‌های این باکتری می‌باشد(۵). از این میان انتروتوکسین A شایع‌ترین سم در مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی می‌باشد(۸).

شیر و فرآورده‌های لبنی آلوده یکی از منابع مهم عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی در انسان به شمار می‌آیند. به دلیل تأمین شرایط مناسب جهت رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها و از سوی دیگر مصرف گسترده آن از سوی افراد مختلف و با شرایط سنی متفاوت، این ماده غذایی می‌تواند به عنوان یکی از منابع بالقوه ایجاد عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی مطرح شود (۱۱). یک منبع متداول برای آلودگی محصولات لبنی پستان گاو بخصوص در حیوانات مبتلا به التهاب پستان استافیلوکوکی است. (٦). همچنین مواد غذایی که بطور دستی تولید می‌شوند در صورت عدم رعایت موازین بهداشتی توسط کارکنان احتمال آلودگی محصول نهایی وجود خواهد داشت چرا که ۵۰٪ از افراد سالم بطور طبیعی *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مجاری بینی، گلو، روی پوست و مو دارند (٦).

پنیر سفید آب نمکی اغلب در کارگاه‌های کوچک یا متوسط

*گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

* مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

mohammadi.kh@gmail.com , mohammadi@iaut.ac.ir

تولید می‌شود. تولید دستی پنیر توسط افراد نیمه حرفه‌ای ممکن است احتمال خطر آلودگی این محصول به *استافیلوکوکوس اورئوس* را افزایش دهد. در مطالعه حاضر میزان آلودگی پنیرهای سفید آب نمکی به *استافیلوکوکوس اورئوس* و خصوصیات جدایه‌ها از نظر توان بالقوه تولید انتروتوکسین به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (multiplex PCR) توضیح داده می‌شود.

مواد و روش کار

نمونه‌های پنیر سفید آب نمکی

در این مطالعه توصیفی مقطعی طی سال ۱۳۹۲ تعداد ۱۲۰ نمونه پنیر سفید آب نمکی از فروشگاه‌های مختلف شهر تبریز خریداری و در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. به منظور حذف عوامل مخدوش کننده بر میزان آلودگی پنیرها به *استافیلوکوکوس اورئوس*، از آزمایش پنیرهایی که در موقع نمونه‌برداری احتمال آلودگی متقاطع (cross contamination) وجود داشت، اجتناب شد.

جداسازی و شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

به منظور شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه پنیر همگن شده در کیسه‌های زیپ‌دار استریل حاوی ۹۰ میلی‌لیتر مایع رقیق کننده پنیر (کلرید سدیم ۰/۵٪، کازیتون ۱٪ و سیترات سدیم ۲٪) (Merck) توزین شد و به مدت ۲ دقیقه توسط استومیکر همگن گردید. جهت تهیه سوسپانسیون یکنواخت به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. رقت‌های سریال با افزایش ۱ میلی‌لیتر از هر رقت به ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱٪ (وزنی ـ حجمی) تهیه شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در سطح دو پلیت حاوی محیط کشت Baird Parker Agar (B.P.A) (Merck) پخش گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. همزمان جهت افزایش احتمال جداسازی باکتری، مقدار ۲۵ گرم از هر نمونه در ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت Giolitti and Cantoni broth (G.C) (Merck) پس از اضافه کردن ۰/۰۱٪ تلوریت پتاسیم تلقیح گردید و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی غنی‌سازی شد. متعاقباً در سطح محیط B.P.A کشت گردید و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد.

در هر دو روش کلونی‌های احتمالی انتخاب شده و به منظور تهیه کلونی‌های خالص در سطح Plate Count Agar (Merck) کشت شدند. سویه‌ها طبق پروتکل سازمان غذا و داروی امریکا (۱۰) به کمک آزمایش‌های زیر شناسایی شدند: رنگ آمیزی گرم، انعقاد پلاسمای سیتراته در لوله، کاتالاز، مصرف بی‌هوازی گلوکز و مانیتول، حساسیت به لیزوستافین و تولید نوکلئاز مقاوم به حرارت. سپس از هر نمونه ۵ کلونی تأیید شده از نظر ژن انتروتوکسین A مورد آزمایش قرار گرفتند.

پرایمرهای مورد استفاده

تمام پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌اند. الیگونوکلئوتیدها در محدوده ۲۴–۲۰ جفت براساس دمای واسرشته شدن یکسان، حداقل تداخل و تشکیل محصولات با اندازه‌های متفاوت و قابل تشخیص در الکتروفورز ژل آگارز توسط Cremonesi و همکاران (۲۰۰۵) ارائه شده‌اند(۷). پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شدند و در حجم نهایی ۱۰۰ pmol/µl در آب مقطر استریل مخلوط شدند.

جدول ۱– توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (۷)

نام ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر ('3–'5)	اندازه محصول (جفت باز)
23S rRNA	23S-F1200	AGCTGTGGATTGTCCTTTGG	۴۹۹
	23S-R1698	TCGCTCGCTCACCTTAGAAT	
nuc	NUC-F166	AGTTCAGCAAATGCATCACA	۴۰۰
	NUC-R565	TAGCCAAGCCTTGACGAACT	
sea	SEA-F1170	TAAGGAGGTGGTGCCTATGG	۱۸۰
	SEA-R1349	CATCGAAACCAGCCAAAGTT	

استخراج DNA

استخراج DNA به وسیله کیت استخراج توپازژن (Topaz Gene) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با آنالیز دو میکرولیتر از آن به‌روش طیف‌سنجی(NanoDrop 2000, ThermoScientific) انجام شد. تعیین خلوص DNA با استفاده از نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (A ۲۶۰/۲۸۰) با کمک نرم افزار نانودراپ ۲۰۰۰ نسخه V.1.0 انجام شد. غلظت DNA استخراج شده به ۲۵ ng/µl تنظیم شد.

واکنش multiplex PCR

این واکنش در میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری طبق روش Cremonesi و همکاران (۲۰۰۵) انجام گردید (۷). مقدار ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲ واحد آنزیم *Tag* DNA polymerase، ۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR حاوی ۲ میلی مولار مخلوط هر کدام از دزوکسی نوکلئوتیدهای تری فسفات، ۱۰ میکرومولار از جفت پرایمر 23S-F1200 و 23S-R1698، ۲۰ میکرومولار از جفت پرایمرهای *nuc* و *sea* به مخلوط واکنش اضافه و با آب دیوناز عاری از DNase/RNase (سیناژن) به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سیکل‌های دمایی و زمانی مطابق جدول (۲) و در ترمال‌سایکلر (BioRad, USA) انجام پذیرفت. محصول واکنش در ژل آگارز ۲٪ آغشته به (2 µl/100ml) DNA safe stain (سیناژن) الکتروفورز گردید و در زیر نور UV عکس‌برداری شد (UVItec, Cambridge, UK).

جدول ۲- مراحل انجام واکنش mPCR

ردیف	مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه‌ها
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹٤	۵	۱
	واسرشته‌سازی	۹٤	۱	
۲	اتصال	٥٦	۱	۳۰
	بسط	٦٨	۱	
۳	بسط نهایی	۷۲	۷	۱

نتایج

میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیرهای سفید آب‌نمکی

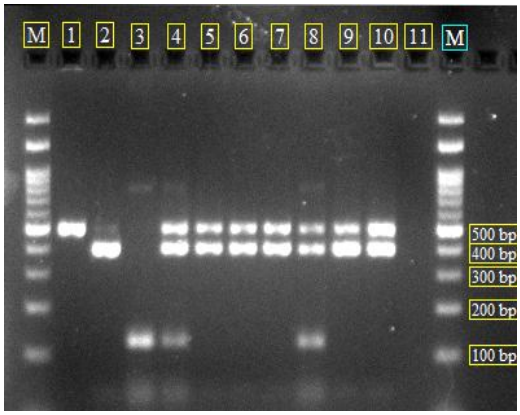
براساس روش کشت در محیط جامد انتخابی Baird parker agar و تست‌های بیوشیمیایی، *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱۱ (۹/۱٪) نمونه (>۱۰ cfu/g) جداسازی شد. نتایج شمارش در محدوده $۱۰^{۱}$ × ۱/۵ cfu/g تا $۱۰^{٤}$ × ۸/٦ متغیر بود. میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیرهای رسیده در مقایسه با پنیرهای تازه نسبتاً پایین بود. تنها در سه نمونه (۳/٦٪) تعداد باکتری بیشتر از $۱۰^{۳}$ cfu/g بود. هیچ‌کدام از نمونه‌ها از نظر شاخص مسمومیت با *استافیلوکوکوس اورئوس* در حد بحرانی (>$۱۰^{٥}$ cfu/g) نبود (۱۳).

ویژگی پرایمرها

به منظور ارزیابی ویژگی پرایمرها و شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هرجفت پرایمر به تنهایی با سویه مرجع با ژنوتیپ مشخص آزمایش شد. در هر مورد با استفاده از جفت پرایمرهای مورد استفاده، محصول PCR با اندازه مورد انتظار بدون هیچگونه محصول غیر اختصاصی به دست آمد (نگاره۱، ستون۳-۱). واکنش PCR حضور ژن انتروتوکسین A را در سویه مرجع ATCC 6538 تأیید کرد. ویژگی ژن‌های 23S rRNA، *nuc* و *coa* با سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به عنوان کنترل منفی تأیید شد.

تأیید گونه اورئوس با ژن 23S rRNA

ژن 23S rRNA باکتری‌های جداسازی شده با استفاده از جفت پرایمرهای ذکر شده در جدول شماره ۱ طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر داده شد (نگاره ۱). محصول واکنش با اندازه ٤۹۹ جفت نوکلئوتید در تصویر ژل آگارز مشاهده گردید. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از نشانگر bp ۱۰۰ استفاده شد. تمام ۵۵ سویه مشکوک جدا شده از ۱۱ نمونه مثبت که در تست‌های بیوشیمیایی بعنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده شده بودند براساس تکثیر ژن 23S rRNA مورد تأیید قرار گرفتند.



نگاره ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR سویه مرجع (ستون ۳-۱) و mPCR (ستون ۱۱-٤). ستون M: سایز مارکر 100bp plus، ستون ۱: ژن 23s rRNA (٤۹۹ bp)، ستون ۲: ژن ترمونوکلئاز (٤۰۰ bp)، ستون ۳: ژن انتروتوکسین A (۱۸۰ bp)، ستون ٤: mPCR سویه مرجع. ستون‌های ۱۰-۵: همه نمونه‌ها برای ژن‌های 23s rRNA و *nuc* مثبت می‌باشند، ستون ۸: نمونه مثبت برای ژن *sea*، ستون ۱۱: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بعنوان کنترل منفی.

واکنش multiplex PCR

نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه در نگاره ۱ نشان داده شده است. هر جفت پرایمر با موفقیت ژن‌های هدف را در سویه مرجع بدون هیچ گونه باند غیر اختصاصی تکثیر کردند (شکل ۱-ستون ٤). حضور باند ٤۹۹ bp نشانگر وجود ژن 23S rRNA ، حضور باند ٤۰۰ bp نشانگر وجود ژن *nuc* و حضور باند ۱۸۰ bp نشانگر حضور ژن انتروتوکسین A در نمونه‌های مورد آزمایش می‌باشد. از میان ۵۵ جدایه تأیید شده، ٦ (۱۰/۹٪) جدایه دارای هر سه باند بودند.

بحث

به دلیل اهمیت مسمومیت غذایی استافیلوکوکی که از مهمترین مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌آید مطالعات زیادی در خصوص میزان شیوع این نوع آلودگی، پراکندگی ژن‌های انتروتوکسین و روش‌های کنترل آن در مواد غذایی انجام شده است. در مطالعه‌ای Tekins و Ozdemir (۲۰۰٦) تعداد ۵۰ نمونه پنیر سبزیجات نرسیده ون (Van) را از نظر خصوصیات میکروبی بخصوص باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی O157:H7* و *سالمونلا* مورد مطالعه قرار دادند. طبق نتایج این مطالعه آلودگی پنیرها به *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* به ترتیب ٦/۱ cfu/g و ۳/٦۸ بود. در این تحقیق *استافیلوکوکوس اورئوس* از تمام نمونه‌های پنیر جداسازی شد که میزان آلودگی از ۲/٤۸ cfu/g تا ۷/۱۵ متغیر بود و در ۵٤٪ نمونه‌ها تعداد آن بیشتر از $۵/۰ \times ۱۰^{۵}$ cfu/g بود. هیچ کدام از نمونه‌ها به *اشریشیاکلی O157:H7* آلوده نبودند اما در ۳ نمونه از ۵۰ نمونه *سالمونلا* جداسازی شد (۱۹).

در مطالعه دیگری Akineden و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ۱۸۱ نمونه پنیر تهیه شده از شیر بز را از مراکز عرضه این پنیر در شهر Hesse آلمان خریداری و از نظر وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار دادند که ۱٤ نمونه پنیر (۷/۷٪) مثبت شناسایی شدند. از این تعداد ٦٤ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شد که از نظر ژنتیکی قابلیت تولید انتروتوکسین را داشتند. ژن‌های کد کننده انتروتوکسین به روش PCR مورد مطالعه قرار گرفتند و تولید انتروتوکسین‌های A-E به روش ایمونولوژیکی تأیید شدند (۲).

شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطح گونه با ژن 23S rRNA امکان‌پذیر است (۷). همچنین حضور ژن نوکلئاز مقاوم به حرارت (*nuc*) ارتباط قوی با تولید انتروتوکسین دارد و به عنوان یک شاخص آلودگی مواد غذایی با *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌زا می‌باشد (۱۸). بر این اساس در مطالعه حاضر استافیلوکوکوس اورئوس از ۱۱ نمونه پنیر (۹/۱٪) جداسازی شد و باکتری‌های دارای ژن *sea* فقط از ۲ نمونه پنیر نرسیده جدا شدند. بعلت اینکه *sea* در مسمومیت‌های غذایی بیشترین نقش را دارد و به طور عمده از سویه‌های انسانی تولید می‌شود (۲۰) می‌تواند بیانگر آلودگی طی فرایند تولید باشد.

در تحقیقی دیگر Ertas و همکاران (۲۰۱۰) وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* و ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی را در پنیر گوسفندی و دسرهای تهیه شده از شیر گاو به روش multiplex PCR مورد مطالعه قرار دادند. در مجموع ۱۵۰ نمونه شامل ۵۰ نمونه دسر و ۱۰۰ نمونه پنیر گوسفندی آزمایش شدند. از ٦٠ (٦٠٪) نمونه پنیر گوسفندی و ٢٦ (٥٢٪) نمونه دسر *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شد. در مجموع از ٨٦ نمونه مثبت، ٤٣٠ کلونی مورد آزمایش قرار گرفت که ژن‌های انتروتوکسین *sea*، *seb* و *sed* به ترتیب در ٥ (١/٦٪)، ٢ (٠/٦٪) و ١ (٠/٣٪) نمونه تأیید شدند(٩).

Rall و همکاران (۲۰۰۸) نیز فراوانی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* را در شیر خام و پاستوریزه گاوی مورد مطالعه قرار دادند. از ٥٤ نمونه شیر خام مورد آزمایش ۳۸ نمونه (٧٠/٤٪) به مقدار بیشتر از cfu/ml $۸/۹\times۱۰^{۵}$ آلوده بودند. این باکتری در ۸ نمونه از شیرهای پاستوریزه قبل از تاریخ انقضاء و در ۱۱ نمونه شیر پاستوریزه بعد از تاریخ انقضاء جداسازی شد. از ۵۷ سویه مورد مطالعه، ٦٨/٤٪ حداقل دارای یک ژن کد کننده انتروتوکسین بود. ژن کد کننده انتروتوکسین A، *sea* بیشترین فراوانی را داشت (۱۷).

Morandi و همکاران (۲۰۰۷) فراوانی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در باکتری‌های جداسازی شده از شیر بوفالو، گاو، بز، گوسفند، گاومیش و محصولات لبنی و متعاقباً تولید انتروتوکسین را ارزیابی کردند. در مجموع ۱۱۲ سویه از نظر تولید انتروتوکسین به روش ایمونولوژیکی و لاتکس آگلوتیناسیون بررسی شدند و همزمان ژن‌های انتروتوکسین به روش multiplex PCR مورد مطالعه قرار گرفتند. از ۱۱۲ سویه مورد مطالعه، ٦٧٪ دارای ژن‌های انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شد اما فقط ٥٢٪ انتروتوکسین قابل تشخیص تولید کردند (١٦).

در پژوهش دیگری توسط اثنی‌عشری و همکاران (۱۳۹۱) ۷۵ نمونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گاومیش برای بررسی حضور ژن‌های مربوط به انتروتوکسین-های A-E با استفاده از روش multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد میزان شیوع تنوع ژن‌های مربوط به انتروتوکسین‌های معمول در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از شیر گاومیش در شهرستان تبریز پایین بود. بطوریکه از ۷۵ نمونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یک جدایه دارای هر دو باند انتروتوکسین‌های *seb* و *sec* بود و سه جدایه دیگر فقط دارای ژن انتروتوکسین *sec* و ژن انتروتوکسین *sea* در هیچکدام از جدایه‌ها شناسایی نشد(۱).

طبق قوانین اتحادیه اروپا حداکثر مقدار مجاز برای *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر $۱۰^{۵}$ cfu/g میباشد. در آلودگی‌های بیشتر از این تعداد احتمال تولید انتروتوکسین در حد مسمومیت‌زا وجود دارد و در این موارد انجام آزمون انتروتوکسین ضروری اعلام شده است. در مطالعه حاضر آلودگی هیچ یک از نمونه‌ها در حد بحرانی نبود. طی فرآیند تخمیر پنیر، تولید اسید لاکتیک تجزیه نشده و کاهش pH بر فعالیت بسیاری از باکتری‌های بیماریزا اثر بازدارندگی دارد. هرچند که سایر مکانیسم‌هایی نیز مطرح می‌باشد. *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است در اثر تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی از باکتری‌های اسید لاکتیک، پراکسید هیدروژن یا نایسین متوقف شود (١٤). در مطالعه‌ای توسط Mohammadi و Hanifian (٢٠١٤) با تلقیح $۱۰^{۵}$ cfu/g باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر سفید فراپالایشی، تعداد باکتری طی دوره رسیدن و نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت و ٤٥ روز پس از تولید *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی نشد. طبق نتایج این مطالعه استفاده از کشت آغازگر و نگهداری در شرایط سرد به طور معنی‌داری بر رشد و تولید انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر بازدارندگی داشت (۱۵). محدوده دمایی برای تولید انتروتوکسین با توجه به نوع ماده غذایی متفاوت است. اما بطور کلی در دمای ۱۰ تا ٤٥ درجه سلسیوس و دمای مطلوب ۳۷ درجه سلسیوس می‌باشد. تولید

انتروتوکسین وابسته به رشد است و چون رشد در دماهای پایین کندتر صورت می‌گیرد، مدت زمان زیادی لازم است تا انتروتوکسن قابل تشخیص تولید شود. بیشتر سویه‌های استافیلوکوکی در pH بین ٤/٥ تا ٩/٣ رشد می‌کنند (مطلوب ٧/٥–٧) اما شرایط تولید انتروتوکسین بسیار محدودتر از رشد می‌باشد. تولید انتروتوکسین محدود به pH ٩–٥/١٥ می‌باشد(٦). اگر چه تیمار پنیر بسیاری از باکتری‌های بیماریزا در پنیر را از بین می‌برد، اما در مورد بعضی از باکتری‌ها مانند سالمونلا، لیستریا، اشریشیاکلی O157:H7 به تنهایی موثر نیست (٣). با توجه به اینکه طی فرایند طبیعی تخمیر در پنیرهای سفید آب نمکی pH به زیر حد بحرانی از نظر تولید انتروتوکسین کاهش می‌یابد، *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیرهای سفید آب نمکی که طبق اصول بهتر در تولید ساخته شده و در شرایط یخچال نگهداری شوند، معمولاً قادر به تولید انتروتوکسین نخواهد بود. اما در صورت نگهداری پنیرها در شرایط مساعد از نظر تولید و ترشح انتروتوکسین A، علیرغم آلودگی کم نمونه‌های آزمایش شده به استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن *sea*، این نوع پنیر می‌تواند به عنوان یک مخاطره بالقوه مطرح باشد.

تشکر و سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به خاطر تأمین اعتبار این تحقیق، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

١. اثنی‌عشری، م.، شایق، ج.، نصرالهی عمران، آ. (١٣٩١): مطالعه میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسین‌های معمول در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز به روش Multiplex PCR، مجله بهداشت مواد غذایی، ٢ (٢): ٦١–٦٨.

2. Akineden, O., Ahmed Hassan, A., Schneider, E. Usleber, E. (2008): Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. Int. J. of Food Microbiol. 124: 211-216.
3. Altekruse, S.F., Timbo, B.B., Mowbray, J.C. Bean, N.H., Potter, M.E. (1998): Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. J. Food Prot. 61: 1405-1407.
4. Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E. (2005): Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. Meat. Sci. 71: 549-556.
5. Bergdoll, M.S. (1983): Enterotoxins. P. 559-598. In C.S.F. Easton and Adlam (ed.), Staphylococci and staphylococcal infections. Academic press, London, United Kingdom.
6. Bergdoll, M.S., Lee Wong, A.C. (2006): Staphylococcal enterotoxins, In:Riemann, H.P., Cliver, D.O. Foodborne Infections and Intoxications. Third Edition, Elsevier, P: 528, 531.
7. Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B. (2005): Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol. Cell. Probe. 19: 299-305.
8. Danielsson-Tham, M.L. (2013): Staphylococcal Food Poisoning. In: Food Associated Pathogens, eds. Tham, W., Danielsson-Tham, M.L., Science Publishers, p.261.
9. Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y., Kum, E. (2010): Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. Int. J. Food Microbiol. 142: 74 –77.
10. FDA: (1998). Bacteriological analytical manual (8th ed., Revision A). U.S: Department of Health & Human Services. http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm.

11. Hanifian, S., Karim, G. (2006): A study on the effect of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on survival of *Yersinia enterocolitica* during manufacture and storage of Iranian white cheese. Iran. J. Vet. Sci. 3: 485–492.
12. Jørgensen, H.J., Mathisen, T., Løvseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S. (2005): An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. FEMS Microbiol. Lett. 252: 267-272.
13. Le Loir, Y.*L., Baron, K., Gautier, M. (2003): Staphylococcus aureus and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2: 63–76.*
14. Le Marc, Y., Valík, L., Medveďová, A. (2009): Modelling the effect of the starter culture on the growth of *Staphylococcus aureus* in milk. Int. J. of Food Microbiol. 129: 306–311.
15. Mohammadi, K., Hanifian, S. (2014): Growth and enterotoxin production of Staphylococcus aureus in Iranian ultra–filtered white cheese. International Journal of Dairy Technology. doi: 10.1111/1471-0307.12158
16. 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. Vet. Microbiol. 124: 66–72.
17. Rall, V.L.M., Vieira, F.P., Rall, R., Vieitis, R.L., Fernandes, A. (2008): PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Vet. Microbiol. 132: 408–413.
18. Tamarapu, S., McKillip, J.L., Drake, M. (2001): Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. J. Food Prot.64: 664–8.
19. Tekins, K.K., Ozdemir, Z. (2006): Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. Food Control, 17:707–711.
20. Wei, H.L., Chiou, C.S., 2002. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. Epidemiology and Infection 128, 15–20.