مطالعه بیوتیپی *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از شیر و فرآورده‌های آن در شهرستان تبریز

جلال شایق[۱]*، سیده گیتا مهدیلو[۲]

۱- استادیار گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی و کشاورزی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.
۲- دانش‌آموخته دانشکده زیست‌شناسی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: jalalshayegh@iaushab.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۳/۱۱/۱۱ پذیرش نهایی: ۹٤/۷/٤)

چکیده

دانسته‌ها در مورد خصوصیات فنوتیپی *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از شیر و فرآورده‌های آن در شهرستان تبریز بسیار محدود است. هدف از این مطالعه، بررسی بیوتیپ در باکتری مورد مطالعه بود. به این منظور تعداد ٤٨ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام گاو (٢٤ جدایه)، پنیر محلی (۱۲ جدایه)، بستنی سنتی (۱۲ جدایه) که قبلاً از سطح شهر تبریز جمع‌آوری و جداسازی شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفتند. روش بیوتایپینگ با استفاده از واکنش آزمایش‌های استافیلوکیناز، بتا-همولیزین، انعقاد پلاسمای گاو و واکنش کریستال‌ویوله انجام پذیرفت. از میان ٤٨ جدایه مورد مطالعه، ۲۳ (٤۷/۹ درصد) جدایه متعلق به اکووار انسانی و دو جدایه متعلق به اکووار گوسفندی (٤/۲ درصد) و مابقی جدایه‌ها در اکووارهای غیر میزبان خاص بیوتیپ‌بندی شدند. با توجه به میزان بالای آلودگی فرآورده‌های شیر به اکووارهای انسانی این فرض تقویت می‌شود که این اکوارها به‌واسطه دست‌کاری انسانی از این طریق به فرآورده‌های دامی انتقال یافته باشند.

واژه‌های کلیدی: ***استافیلوکوکوس اورئوس*، بیوتیپ، اکووار، شیر و فرآورده‌های آن**

مقدمه

استافیلوکوکوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت متعلق به خانواده میکروکوکاسه هستند. مهم‌ترین آن‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* است که به‌شکل فلور طبیعی پوست یا بینی و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا مطرح می‌گردد. این باکتری با تولید انواع مختلف عوامل حدت پیکری و ترشحی، گستره وسیعی از عفونت‌ها را ایجاد می‌کند. ایجاد مسمومیت‌های غذایی توسط این باکتری از اهمیت ویژه‌ای در بهداشت مواد غذایی و به‌ویژه در شیر و فرآورده‌های آن برخوردار است (Kluyansj and Nasal, 1997). در چند دهه گذشته مشخص شده است که گروه مشخصی از استافیلوکوک‌ها در ایجاد مسمومیت‌های غذایی نقش دارند. آلودگی مواد غذایی با سویه‌های انسانی استافیلوکوکوس اورئوس از اهمیت بیشتری برخوردار است (Accol *et al*., 2003). این امر لزوم مطالعات فنوتیپی و ژنوتیپی را برای یافتن منشا آلودگی این ارگانیسم افزایش می‌دهد.

اگر چه جداسازی و شناسایی آزمایشگاهی این باکتری کار چندان دشواری نمی‌باشد، اما به‌دلیل هتروژنسیته (Heterogeneity) بالای درون گونه‌ای باکتری، مطالعات ژنوتیپی و فنوتیپی از اهمیت بالایی برخودار است (Dastmalchi Saei and Ahmadi, 2010). چرا که به‌نظر می‌رسد سویه‌های محدودی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد مسمومیت‌های غذایی نقش دارند (Fitzgerald *et al*., 1997). تاکنون مطالعات فنوتیپی و ژنوتیپی فراوانی برای مطالعات درون گونه‌ای این باکتری ارایه شده‌اند. در سال‌های اخیر روش‌های مختلف مولکولی برای کار پیشنهاد شده است. از آن جمله هضم کروموزومی DNA (Weller, Multilocus ،(Busch and Nitschko,1999; 2000 Sequence Typing (Enright *et al*., 2000)، Pulsed-field Gel Electrophoresis (Melles *et al*., 2007) و تعیین تیپ بر اساس آنالیز ژن‌های Spa (Strommenger *et al*., 2008)، کوآگولاز (Ishino *et al*., 2007) و *aroA* (Marcos *et al*., 1999) متداول‌ترند. با این وجود برخی از این روش‌ها برای مطالعات درون گونه‌ای از موفقت زیادی برخودار نبوده‌اند (Dastmalchi Saei and Ahmadi, 2010). از سوی دیگر برخی دیگر از این روش‌ها به‌شکل عمومی قابل دسترس نیستند. این امر موجب شده است که به‌رغم گذشت سالیان متمادی، برخی از روش‌های تعیین تنوع به روش‌های فنوتیپی هم‌چنان ارزش خود را حفظ نمایند.

یکی از روش‌های موفق تعیین فنوتیپ، سیستم تعیین بیوتیپ با استفاده از ٤ آزمون بررسی قدرت تولید استافیلوکیناز، انعقاد پلاسمای گاو، الگوی رشد در کریستال‌ویوله و فعالیت ß-همولیتیکی می‌باشد. بر این اساس می‌توان سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از گونه‌های مختلف حیوانات و انسان را در ۹ گروه بیوتیپی قرار داد. چهار گروه از ۹ گروه بیوتیپی شامل اکووارهایی هستند که به‌نظر می‌رسد با یک میزبان خاص از حیوانات در ارتباط باشند. در حالی‌که ۵ گروه بیوتیپی دیگر میزبان خاصی ندارند. چهار گروه اکواری شامل دو اکوار انسانی و سه اکوار گاوی، گوسفندی و طیور می‌باشند. اولبار مایر (Meyer) در سال ۱۹٦٦ این روش را به‌عنوان روشی موفق در افتراق گونه‌های جدا شده از انسان و حیوانات معرفی کرد و یافته‌های خود را بر اساس طرح بیوتیپ‌بندی تعریف نمود (Devriese *et al*., 1984).

اگرچه تاکنون مطالعات متعددی در خصوص تعیین ژنوتیپ *استافیلوکوکوس اورئوس* در منطقه تبریز انجام گرفته است (Shayegh *et al*., 2013)، اما داشته‌ها در مورد ویژگی‌های فنوتیپی این باکتری که از شیر و فرآورده‌های آن جداسازی شده‌اند، بسیار محدود است. لذا هدف این مطالعه، بررسی بیوتیپ *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از شیر و فرآورده‌های آن در منطقه تبریز –به عنوان یک روش مطالعه فنوتیپی– بود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌ها

تعداد ٤٨ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام گاو (٢٤ جدایه)، پنیر محلی (جدایه ١٢) و بستنی سنتی (١٢ جدایه) که از سطح شهرستان تبریز جمع‌آوری شده بود به‌عنوان نمونه‌های مورد مطالعه استفاده شد. لازم به توضیح است، بر روی کلیه جدایه‌ها آزمایش‌های کامل بیوشیمیایی انجام گرفت و تعلق آن‌ها به گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* اثبات شد.

روش تعیین بیوتیپ

روش بیوتایپینگ با استفاده از واکنش آزمایش‌های استافیلوکیناز و بتا– همولیزین و انعقاد پلاسمای گاو و هم‌چنین واکنش کریستال‌ویوله به‌شرح ذیل انجام پذیرفت:

– ارزیابی قدرت تولید استافیلوکیناز

برای انجام این آزمایش به‌جای استفاده از روش ارزیابی استافیلوکیناز پیشنهادی توسط دوریس و همکاران (Devriese *et al*., 1884) از روش جایگزین، یعنی استفاده از توانایی هیدولیز کازئین استفاده گردید (Rajamohan and. Kanak, 2000). به این ترتیب که ابتدا ٢ میلی‌لیتر سرم انسانی به محیط جامد شیر بدون چربی (Skimmed milk) اضافه شده و باکتری مورد مطالعه بر روی آن تلقیح گردید. پس از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در ٣٧ درجه سلسیوس، مشاهده هاله‌ای شفاف با لبه‌های مشخص که به «*پدیده مولر*» (Muller's phenomenon) معروف است، به‌عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شد.

– آزمایش بتا– همولیزین

در این آزمایش قابلیت تولید بتا–همولیزین (اسفنگومیلین C) توسط سویه‌های باکتری با استفاده از روش کشت نقطه‌ای در محیط آگار خون‌دار (حاوی ٥ درصد خون گوسفندی) انجام شد.

– قدرت انعقاد پلاسمای گاو

در این آزمایش ابتدا پلاسمای گاو تهیه شد و به نسبت ١ به ٣ رقیق و ٠/٥ میلی‌لیتر از آن در لوله آزمایش به قطر ١٠ میلی‌متر ریخته شد. سپس بر روی این پلاسما مقدار ٠/١ میلی‌لیتر از کشت تازه باکتری کشت داده شده در محیط قلب و مغز اضافه گردید. واکنش‌ها بعد از ٦ ساعت گرمخانه‌گذاری در ٣٧ درجه سلسیوس قرائت گردید.

– رشد بر روی محیط کریستال‌ویوله آگار

ابتدا محیط کشت کریستال‌ویوله به‌صورت دو پلیت به‌ترتیب حاوی ٦ و ٨ میلی‌گرم در لیتر کریستال‌ویوله به محیط کشت تریپتیکیس سوی آگار (Trypticase soy agar) تهیه گردید و سپس جدایه‌های مورد مطالعه به‌صورت نقطه‌ای بر روی آن کشت و نتایج پس از یک و نیز دو روز گرمخانه‌گذاری در ٣٧ درجه سلسیوس، قرائت گردید. ظهور کلونی‌های آبی یا بنفش‌رنگ باکتری، با یا بدون نقاط نارنجی به‌عنوان تیپ C؛ رشد شفاف یا زرد روشن و زرد و گاهی با حاشیه بنفش

رنگ به‌عنوان تیپ A؛ و رشد سفید یا سفید با جلای آبی‌رنگ به‌عنوان تیپ B در نظر گرفته شد. برای تعیین بیوتیپ از جدول (۱) استفاده شد.

جدول (۱)- بیوتیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* پیشنهادی دوریس و همکاران (Devriese *et al*., 1884)

بیوتیپ (علایم اختصاری)	استافیلوکیناز	β-همولیز	انعقاد پلاسمای گاو	رشد در محیط کریستال ویوله
اکووارهای با گونه میزبان خاص				
اکووار انسانی (He)	+	−	−	C
اکووار انسانی *β+ (He)	+	+	−	C
اکووار مرغی (Pe)	−	−	−	A
اکووار گاوی (Be)	−	+	+	A
اکووار گوسفندی (Oe)	−	+	+	C
بیوتیپ‌های با گونه غیر میزبان خاص				
۱ = K- ß- CV :C*	−	+	−	C
۲ = K- ß+ CV :A*	−	+	−	A
۳ = K+ ß- CV :A*	+	−	−	A
٤ = K+ ß+ CV :A*	+	+	−	A
٥ = K- ß- CV :C*	−	−	−	C

(*): K استافیلوکیناز، β: همولیز β، CV: محیط کریستال‌ویوله

یافته‌ها

نتایج از آزمون‌های تعیین بیوتیپ ٤٨ *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر و فرآورده‌های آن در جدول (۲) خلاصه شده است. در مطالعه حاضر از میان ٤٨ جدایه، ۲۳ (٤٧/٩ درصد) متعلق به اکووار انسانی بودند. در این میان تنها دو جدایه متعلق به اکووار گوسفندی (٤/۲ درصد) و بقیه (٤٧/٩ درصد) جدایه‌ها در اکووارهای غیر میزبان خاص یا NHS داخل گروه‌های ۱ (۱۲/٥٪) و ٥ (۳٥/٤ درصد) بیوتیپ‌بندی شدند. در مورد اکووارهای با منشأ گاوی و مرغی هیچ نمونه‌ای یافت نشد. از تعداد ۲۳ جدایه متعلق به اکووار انسانی، ۷ نمونه مربوط به پنیر محلی، تعداد ۱۱ نمونه مربوط به شیر خام گاو و ٥ نمونه مربوط به بستنی بودند.

جدول (۲)- نتایج حاصل از بیوتیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

منبع جدایه	اکووار انسانی	اکووار انسانی β+*	اکووار گوسفندی	۱ (K–β+CV :C*)	۵ (K–β–CV :C*)
شیر خام	۷	٤	۱	۳	۹
پنیر محلی	۳	٤	–	۱	٤
بستنی	۳	۲	۱	۲	٤
جمع	۱۳ (٪۲۷/۱)	۱۰ (٪۲۰/۱)	۲ (٪٤/۲)	٦ (٪۱۲/۵)	۱۷ (٪۳۵/٤)

(*): K استافیلوکیناز، β: همولیز β، CV: محیط کریستال‌ویوله

بحث و نتیجه‌گیری

روش بیوتیپ‌بندی پیشنهادی دوریس و همکاران به‌عنوان یک روش ساده، متداول و مورد قبول از سوی محققین مختلف مطرح می‌باشد (Soltan Dallal, *et al*., 2010). این روش توانایی تشخیص افتراقی منشأ استافیلوکوک‌ها بر اساس میزبان مربوطه را دارد (Kital *et al*., 2005). در مطالعه حاضر میزان آلودگی با جدایه‌ها متعلق به اکووار انسانی ٤۷/۹ درصد به‌دست آمد و تنها دو جدایه (٤/۵ درصد) متعلق به اکووار گوسفندی شناسایی شدند. در میان جدایه‌های حاصل از شیر خام، میزان آلودگی با جدایه‌های NHS معادل ۵۰ درصد برآورد گردید که بیشتر از اکوارهای انسانی بود. این میزان در محصولات شیر و فرآورده‌های آن (پنیر و بستنی) به نفع اکوارهای انسانی (۵۰ درصد) تغییر می‌یافت. این حالت به‌ویژه در میان جدایه‌های پنیر (۵۸/۳ درصد) محسوس‌تر بود.

با توجه به میزان بالای آلودگی فرآورده‌های شیر به اکوارهای انسانی، این فرض تقویت می‌شود که به‌دلیل دست‌کاری بیشتر این نمونه‌ها، منابع آلودگی انسانی به‌عنوان منابعی که نقش بیشتری در مسمومیت‌های غذایی انسان دارند، مطرح می‌شوند. به‌خصوص این فرض زمانی پررنگ‌تر می‌شود که برخی از مطالعات، فراوانی تعدادی از عوامل دخیل در مسمومیت استافیلوکوکی را در میان اکوارهای انسانی بیشتر گزارش می‌کنند (Soltan Dallal *et al*., 2010). در برخی مطالعات نشان داده شده است که میزان NHS در مقایسه با سایر اکوارها در جدایه‌های حاصل از شیر خام بیشتر است (Casciano *et al*., 2003). هم‌چنین نتایج مطالعات مختلف حاکی از فراوانی میزان اکوارهای انسانی در فرآورده‌های شیر و گوشت می‌باشد (Kerouanton *et al*., 2007; Normano *et al*., 2007). نتایج مطالعات فوق با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. اما نتایج مطالعه حاضر زمانی از اعتبار بیشتری برخوردار خواهد بود که با میزان بالای از جدایه‌ها تکرار گردد. چرا که نتایج برخی مطالعات چندان سازگاری با مطالعه حاضر ندارند (Soltan Dallal, *et al*., 2010).

اگر چه برخی از مطالعات، تفاوتی بین سویه‌های انسانی و NHS از نظر توانایی ایجاد بیماری قائل نیستند (Capital *et al*., 2002)، با این وجود فراوانی برخی از عوامل حدت در میان اکوارهای انسانی بیشتر است. برای مثال سلطان‌دلال و همکاران میزان فراوانی ژن مولد توکسین TSST-1 را در اکوارهای انسانی ٦٦/۷ درصد گزارش کردند (Soltan Dallal, *et al*., 2010).

در مطالعه دیگری که بر روی گوشت طیور انجام شد تعداد اکووارهای انسانی مولد آنتروتوکسین در مقابل سایر جدایه‌ها شامل اکووارهای طیور و NHS قابل توجه بود (Kital *et al*., 2005).

در مطالعه حاضر فراوانی سویه‌های جدا شده متعلق به اکوارهای انسانی در مقایسه با دیگر اکوارهای شناخته شده بیشتر است. اکوارهای انسانی به‌واسطه دست‌کاری مواد غذایی هنگام جابه‌جایی، تولید و فرآوری به شیر و فرآورده‌های آن انتقال می‌یابند. این موضوع اهمیت و نقش آلودگی فرآورده‌های شیر با منشأ انسانی را تقویت می‌کند.

منابع

- Acco, M., Ferreira, F.S., Henriques, J.A.P. and Tondo, E.C. (2003). Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. Food Microbiology, 20: 489–493.
- Busch, U. and Nitschko, H. (1999). Methods for the differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 722: 263–278.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Garcia-Fernandez, M.C. and Moreno, B. (2002). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat in Spain. Poultry Science, 81: 414–421
- Casciano, R., Alberghini, L., Peccio, A., Serraino, A. and Rosmini, R. (2003). Typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk. Veterinary Research Communication, 27: 289–291.
- Devriese, L.A. (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. Journal of Applied Bacteriology, 56: 215–220.
- Dastmalchi Saei, H. and Ahmadi, M. (2010). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on PCR-RFLP analysis of the *aroA* gene. Comparative Clinical Pathology, 19: 163–168.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J. and Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 38: 1008–1015.
- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J. and Kapur, V. (1997). Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Epidemiology and Infection, 119: 261–269.
- Ishino, K., Tsuchizaki, N., Ishikawa, J. and Hotta, K. (2007). Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate Arbekacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Clinical Microbiology, 45: 607–609.
- Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, C.H., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S., *et al*. (1999). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. Journal of Clinical Microbiology, 37: 570-574.
- Melles, D.C., van Leeuwen, W.B., Snijders, S.V., Horst-Kreft, D., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A., *et al*. (2007). Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. Journal of Microbiological Methods, 69: 371–375.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Corrente, M., Parisi, A., *et al*. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology, 115: 290–296.
- Kérouanton, A., Hennekinne, J.A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A., *et al*. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. International Journal of Food Microbiology, 115: 369–375.

- Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., *et al*. (2005). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. Journal of Veterinary Medical Science, 67: 269–274
- Rajamohan, G. and Kanak, L.D. (2000). Role of the N-terminal region of staphylokinase (SAK): evidence for the participation of the N-terminal region of SAK in the enzyme-substrate complex formation. FEBS Letters. 474: 151–158.
- Shayegh, J., Barzegari, A. and Mikaili, P. (2013). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from buffaloes milk. The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, 19(4): 665–668.
- Soltan Dallal, M.M., Salehipour, Z., Eshraghi, S., Fallah Mehrabadi, J. and Bakhtiar, R. (2010). Occurrence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat and dairy products by PCR-RFLP. Annals of Microbiology, 60: 189–196.
- Strommenger, B., Braulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U. and *et al*. (2008). Spa Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. Journal of Clinical Microbiology, 46: 574–581.

Biotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and milk products in Tabriz city

Shayegh, J.[1*], Mahdiloo, S.G.[2]

1- Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran
2- Faculty of Biology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[*]Corresponding author email: jalalshayegh@iaushab.ac.ir
(Received: 2015/1/31 Accepted: 2015/9/26)

Abstract

Knowledge about phenotypic features of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and their products is very limited in Tabriz region. The aim of this study was to determine the biotypes of *S. aureus*. For this purpose, 48 *S. aureus* strains which were previously isolated from cow raw milk (24), traditional cheese (12) and ice cream (12) in Tabriz region were considered. Biotyping was carried out by means of Staphylokinase production, β-hemolysis, coagulation of cow plasma and crystal violates reaction. Among 48 isolates, 23 and 2 strains were belonged to the human and ovine ecovars, respectively. The rest of the isolates were identified as non-host specific ecovars. Regarding the high prevalence rate of human ecovars in this study, it seems that these ecovars may have been transmitted to these products via human handling.

Key words: Milk, Milk products, Biotype, Ecovar, *Staphylococcus aureus*