مطالعه فراوانی شش ژن مولد آنتروتوکسین در *استافیلوکوکوس آرئوس* های جدا شده از پنیرهای محلی به روش Multiplex PCR

سامان مهدوی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه، استادیار گروه میکروبیولوژی، مراغه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: S.mahdavi@iau-maragheh.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۳/۳/۲۸)

چکیده

با توجه به اهمیت انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* به عنوان یکی از عوامل عمده مسمومیت‌های غذایی، بررسی روش‌های متعدد نظیر جداسازی، شناسایی و دسته‌بندی این انتروتوکسین‌ها ضروری است. در این تحقیق ۲۲ سویه باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* کوآگولاز مثبت جدا شده از پنیرهای سنتی روستاهای شهرستان مراغه برای بررسی وجود شش ژن انتروتوکسین با استفاده از روش Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا DNA نمونه‌ها استخراج شده و سپس Multiplex PCR برای حضور ژن‌های انتروتوکسین a، b، g، h، i و j بر روی نمونه‌ها انجام شد. در بین ژن‌های انتروتوکسین مورد آزمایش ژن *Seg* با بیشترین فراوانی (۸ سویه) و ژن *Seb* با کمترین فراوانی (منفی) گزارش شد. در ۹ مورد (۴۰/۹ ٪) از جدایه‌ها، ژن‌های انتروتوکسین مورد آزمایش مشاهده شد. چهار مورد (۱۸/۱۸٪) دارای بیش از یک نوع ژن انتروتوکسین بودند. نتایج مطالعه نشان داد اکثر *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های جدا شده از پنیرهای محلی دارای پتانسیل تولید انتروتوکسین می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس آرئوس*، ژن انتروتوکسین، پنیر، Multiplex PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس یک گونه باکتریایی بسیار مهم مولد مسمومیت غذایی در بسیاری از کشورهای جهان می‌باشد. مسمومیت حاصل از این باکتری، یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی است و در اغلب کشورها از نظر وقوع در لیست سه مسمومیت درجه اول قرار دارد (رضویلر، ۱۳۸۱). این باکتری طیف وسیعی از ترشحات سمی را تولید می‌نماید. در میان سموم تولید شده، انتروتوکسین‌ها دارای اهمیت بسزایی هستند. انتروتوکسین‌ها پروتئین‌های نسبتاً مقاوم به

حرارت بوده و تقریباً به‌طور انحصاری توسط سویه‌های کوآگولاز مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس* تولید می‌شوند و به عنوان عامل استفراغ در مسمومیت‌های غذایی و گاستروآنتریت‌ها مطرح می‌باشند (ملک‌زاده، ۱۳۸۱). انتروتوکسین استافیلوکوکی (SE) برخلاف انتروتوکسین‌های دیگر مثل کلراتوکسین روی سلول‌های اپتیلیال عمل نکرده بلکه اثر استفراغ‌زایی آنها به علت اثر روی عصب واگ و سمپاتیک است و بنابراین می‌توان سموم SE را به‌طور صحیح‌تر نوروتوکسین نامید (رضویلر، ۱۳۸۱). سویه‌های انتروتوکسین‌زای *استافیلوکوکوس آرئوس* می‌توانند یک یا چندین نوع از توکسین‌هایی را که از نظر سرولوژیکی متفاوت هستند هم‌زمان تولید کنند. اخیراً ژن‌های بیشتری از SE (U, K-R) علاوه بر ژن‌هایی که قبلا گزارش شده بود (A-J) تشخیص داده شده است ولی نقش آنها در مسمومیت‌های غذایی مشخص نیست (Letertre *et al*., 2003). بیش از ۹۵٪ از انتروتوکسین‌های این باکتری که ایجاد مسمومیت‌های غذایی می‌کنند جزء گروه A-E هستند (Cremonesi *et al*., 2005).

برای تشخیص توکسین بهترین وسیله = روش سرولوژیکی است ولی خالص‌سازی توکسین جدا شده از غذا هنوز مشکل عمده این نوع آزمایشات می‌باشد (رضویلر، ۱۳۸۱). با این وجود روش‌های مولکولی برای تشخیص ژن‌های مولد سموم SE نیز بطور گسترده‌ای توسعه یافته‌اند. روش‌های مولکولی از جمله مولتی پلکس PCR در مقایسه با آزمایشات ایمونولوژیکی تولید توکسین، سریع‌تر، اختصاصی‌تر، حساس‌تر و قابل اطمینان‌تر است (Pinto *et al*., 2005).

با توجه به عدم رعایت شرایط بهداشتی مناسب در طی شیردوشی و نیز عدم حرارت دادن مناسب شیر قبل از تهیه پنیر سنتی در روستاها و مصرف بالای پنیرهای محلی در ایران، بررسی ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی جدا شده از پنیرهای محلی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق، تعیین فراوانی شش ژن مولد انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس آرئوس*های جدا شده از نمونه‌های پنیر محلی روستاهای شهرستان مراغه به روش Multiplex PCR بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

تعداد ۲۲ سویه باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* کوآگولاز مثبت جدا شده به عنوان نمونه مورد استناد در این مطالعه استفاده شد.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۲۲ نمونه کشت داده شده باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* کوآگولاز مثبت در محیط آبگوشت قلب- مغز (شرکتMerck، کشور آلمان) انجام شد. یک میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی با شدت ۵۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از افزودن ۱ میلی‌لیتر بافر لیزکننده شامل تریس ۱ مولار (pH=۷/۵)، کلریدسدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، C-TAB ۲ درصد بر روی رسوب مخلوط، در دمای $^{\circ}C$ ۸۵ به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد و سپس ویال‌های حاوی سلول‌های لیزشده به مدت ۵ دقیقه با شدت ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال‌های دیگر منتقل و هم حجم آن کلروفرم – ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۴: ۱ به آن اضافه و

به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در ویال و برداشت لایه رویی و انتقال آن به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $37^{\circ C}$ در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال‌ها را برداشته و هم حجم آنها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $-20^{\circ C}$ قرار داده شده و با سانتریفیوژ با شدت ۱۲۰۰۰×g، DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرو لیتر آب دیونیزه حل گردید (Atashpaz *et al*., 2010).

انجام مولتی پلکس PCR برای ژن‌های انتروتوکسین

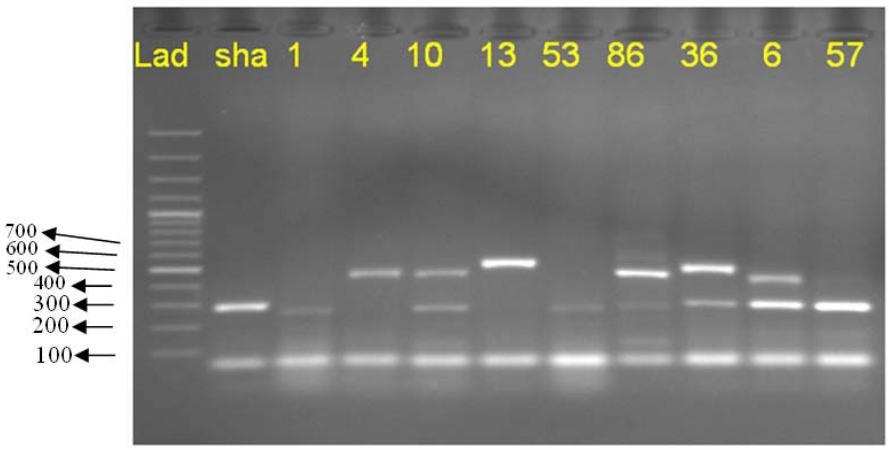
این واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای انتخاب شده برای باکتری‌ها انجام گرفت که پرایمرها و توالی اختصاصی آنها در جدول (۱) آورده شده است. کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ۰/۵ میکرومولار و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) مخلوط واکنش را تشکیل می‌دادند. واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و نهایتا یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از Ladder bp ۱۰۰ استفاده شد.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR جهت تشخیص ۶ ژن آنتروتوکسین

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه باند (جفت باز)	منبع
Sea	SEA-F	GCA GGG AAC AGC TTT AGG C	۵۲۱	Monday and Bohach, 1999
	SEA-R	GTT CTG TAG AAG TAT GAA ACA CG		
Seb	SEB-F	ACA TGT AAT TTT GAT ATT CGC ACT G	۶۶۷	Lovseth *et al*., 2004
	SEB-R	TGC AGG CAT CAT GTC ATA CCA		
Seg	SEG-1	AAG TAG ACA TTT TTG GCG TTC C	۲۸۷	Rall *et al*., 2008
	SEG-2	AGA ACC ATC AAA CTC GTA TAG C		
Seh	SHE-F	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG	۳۶۰	Monday and Bohach, 1999
	SHE-R	GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG		
Sei	SEI-1	GGT GAT ATT GGT GTA GGT AAC	۴۵۴	Rall *et al*., 2008
	SEI-2	ATC CAT ATT CTT TGC CTT TAC CAG		
Sej	SEJ-1	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG	۱۴۲	Monday and Bohach, 1999
	SEJ-2	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC		

یافته‌ها

نتایج مربوط به مولتی پلکس PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین و فراوانی باهم بودن این ژن‌ها در یک سویه در جدول ۲ نشان داده شده است. در بین ژن‌های انتروتوکسین مورد آزمایش، ژن *Seg* بیشترین فراوانی (۸ سویه) و ژن *Seb* کمترین فراوانی (منفی) را داشت. تنها در ۹ مورد (۴۰/۹ ٪) از نمونه‌ها، ژن‌های انتروتوکسین مورد آزمایش مشاهده شد. چهار مورد (۱۸/۱۸٪) دارای بیش از یک نوع ژن انتروتوکسین بودند که ژن *Seg* در تمام آنها مشترک بود.



شکل۱- الکتروفورز محصول مولتی پلکس PCR در آگارز ۱/۵ درصد. به ترتیب از سمت چپ به راست شامل: Lad: Ladder ، Sha:*S.aureus* PTCC 1112 ، محل های تشکیل باند: Sha : ۲۸۷bp ، شماره ۱: ۲۸۷ bp ، شماره ۴ : ۴۵۴ bp ، شماره ۱۰ : ۲۸۷ bp و ۴۵۴ bp ، شماره ۱۳ : ۵۲۱ bp ، شماره ۵۳ : ۲۸۷ bp ، شماره ۸۶ : ۲۸۷ bp و ۴۵۴ bp و ۱۴۲ bp ، شماره ۳۶ : ۲۸۷ bp و ۵۲۱ bp ، شماره ۶ : ۲۸۷ bp و ۳۶۰ bp ، شماره ۵۷ : ۲۸۷ bp

جدول۲- فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین و فراوانی باهم بودن این ژن‌ها در یک سویه

تعداد سویه‌ها	ترکیب ژن‌ها	تعداد سویه‌ها	ژن
۱	Sea+Seg	۲	Sea
۱	Seg+Seh	–	Seb
۱	Seg+Sei	۸	Seg
۱	Seg+Sei+Sej	۱	Seh
		۳	Sei
		۱	Sej
		۲۲	**جمع**

بحث و نتیجه‌گیری

مطالـه بـر روی مسـمومیت‌هـای غـذایی بـا منشـاء *اسـتافیلوکوکوس آرئـوس* بـه قـرن ۱۹ بـاز مـی‌گـردد (Abbar, 2010)، زمانی کـه بـه نظـر مـی‌رسـید شـیر و فـرآورده‌هـای آن اهمیـت زیـادی در خصـوص چنـین مسمومیت‌هایی دارند. اعتقاد بـر ایـن اسـت کـه میـزان آلودگی فرآورده‌های شیر بدلیل آلودگی‌هایی اسـت کـه در طی فرآیند تولید آنها اتفاق می‌افتد. تحقیقـات دقیـق نشان داده که منابع آلودگی پنیر شامل شیرخام، شـیر بـا پاستوریزاسیون ناقص و یا آلودگی مجدد شیر پاستوریزه با میکروب‌های ناشی از شیرخام یا از محیطی کـه در آن پنیرسازی انجام می‌شود می‌باشـد (Little *et al*., 2008). در بـین بسـیاری از توکسـین‌هـای خـارج سـلولی *استافیلوکوکوس آرئوس*، انتروتوکسین‌ها بیشترین خطـر را ایجـاد مـی‌کننـد (Akineden *et al*., 2008). طبـق گزارشات محققین، بیشـترین فراوانـی ژن انتروتوکسـین مربوط بـه ژن ***Sea*** مـی‌باشـد (Gilmour and Harvey, 1990). در مطالعه‌ای که بر روی ژن‌هـای انتروتوکسـین *اسـتافیلوکوکوس آرئـوس* از محصـولات لبنـی سـنتی صورت گرفت ۳۱/۱٪ کل سویه‌های جدا شـده از مـواد لبنی، یکی از دو ژن ***Sea*** و ***Seb*** یا هر دو را دارا بود که درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* دارای ژن‌های ***Sea***، ***Seb*** و ***Sea+Seb*** بـه ترتیـب ۱۵/۶ ، ۹/۳ و ۶/۲ درصـد بودنـد (Imani Fooladi *et al*., 2010). نتـایج مشـابهی در ارتبـاط بـا غالـب بـودن ژن ***Sea*** در بـین سـویه‌هـای بـا منشـاء انسـانی گـزارش گردیـده اسـت (Haveri *et al*., 2007). در این تحقیق بیشترین فراوانی ژن انتروتوکسین مربوط بـه ژن ***Seg*** بـود کـه بـا نتـایج تحقیقات سائر و همکاران مطابقت دارد (Sauer *et al*., 2008). در تحقیقی بر روی میزان فراوانی ژن‌های مولـد انتروتوکسین استافیلوکوکی از نمونه‌های شیر، بیشـترین فراوانی مربوط به ژن ***Seg*** گزارش شـد (Ahmadi and Dastmalchi Saei, 2013). در مطالعه‌ای مشخص شـده است که انتروتوکسین‌های G، I و J بیش از سـایر انـواع انتروتوکسین در بین سویه‌های *استافیلوکوکوس آرئـوس* جدا شده از موارد التهاب پستان گـاو شـایع مـی‌باشـند (Akineden *et al*., 2001). در تحقیقی دیگر که بر روی میـزان شـیوع ژن‌هـای انتروتوکسـین‌هـای معمـول در *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های جدا شده از شیر گـاومیش صورت گرفته بود، بیشترین میزان شیوع، مربوط بـه ژن ***Sec*** گزارش شـد و ژن ***Sea*** در هـیچ‌کـدام از سـویه‌هـا شناسـایی نشـد (اثنـی عشـری و همکـاران، ۱۳۹۱). انتروتوکسین ***Seg*** بیشـتر بـا منشـاء دامـی مـی‌باشـد و نشان‌دهنده آلودگی نمونه‌های پنیر با شیر خام آلـوده بـا منشاء دامـی اسـت کـه ایـن امـر بـه کـم بـودن میـزان دستکاری انسانی در خصوص شیر خام صحه می‌گذارد. در اکثـر مطالعـات پیشـین، مـوارد مثبـت آلـودگی‌هـای محصولات لبنی به *استافیلوکوکوس آرئـوس* حـاوی ژن انتروتوکسین با منشاء انسانی گزارش شده بـود ولـی در تحقیـق اخیـر، اکثـر آلـودگی بـا منشـاء دامـی بـوده و دستکاری انسانی در آن دخیل نیست که این امر با نتایج مطالعات اثنی عشری و همکـاران (۱۳۹۱) و احمـدی و دستمالچی ساعی (۲۰۱۳) مطابقـت دارد. انتشـار وسـیع سویه‌های مولد انتروتوکسین در شیر، خطر حضور چنین سویه‌هایی را در فرآورده‌های غذایی افزایش می‌دهد هر چند که میزان آن در مقایسه با خـود شـیر پـایین اسـت (Haveri *et al*., 2007). نتایج مطالعات بدست آمـده در این تحقیق در مقایسه بـا سـایر مطالعـات، نشـان‌دهنـده

اخـتلاف در پراکنـدگی ژن‌هـای مـوثر در تولیـد انـواع انتروتوکسین در بین سویه‌های مختلف *استافیلوکوکوس آرئوس* می‌باشـد کـه ایـن امـر احتمـالا از تفـاوت‌هـای جغرافیایی و نیز اختلاف در منشاء اکولوژیکی سویه‌های جدا شده (شیر، انسان و دام‌های مختلف) ناشی می‌شود.

منابع

- اثنی عشری، مهرداد؛ شایق، جلال و نصرالهی عمران، آیت‌اله (۱۳۹۱). مطالعه میزان شیوع ژن‌های آنتروتوکسین‌هـای معمول در *استافیلوکوکوس آرئوس*های جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرسـتان تبریـز بـه روش Multiplex PCR. مجله بهداشت مواد غذایی، سال دوم، شماره۲، صفحات: ۶۸-۶۱.
- رضویلر، ودود (۱۳۸۱). میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسـمومیت‌هـای غـذایی. چـاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۱۲۹-۱۲۸.
- ملک‌زاده، فریدون (۱۳۸۱). میکروب شناسی. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه: ۶۵.
- Ahmadi, M. and Dastmalchi Saei, H. (2013). Detection of the enterotoxin-producing genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk by PCR in Tabriz and Urmia regions. Iranian Veterinary Journal, 9(3): 27-35.
- Akineden, O., Ahmed Hassan, A., Schneider, E. and Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 124: 211-216.
- Akinden, O., Annemuller, C., Hassan, A.A., Lamller, C., Wolter, W. and Zschock, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 8: 959-964.
- Atashpaz, S., Khani, S., Barzegari, A., Barar, J., Vahed, S.Z., Azarbaijani, R., *et al.* (2010). A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. Mikrobiologiia, 79(4): 562-566.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., *et al.* (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes, 19: 299-305.
- Gilmour, A. and Harvey, J. (1990). Staphylococci in milk and milk products. Journal of Applied Microbiology, 147s-166s.
- Haveri, M., Roslof, A., Rantala, L. and Pyprala, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. Journal of Applied Microbiology, 103: 993-1000.
- Imani Fooladi, A.A., Tavakoli, H.R. and Naderi, A. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 2(3): 137–142.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. and Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology, 95: 38–43.
- Little, C.L., Rhoades, J.R., Sagoo, S.K., Harris, j., Greenwood, M., Mithani,V., *et al.* (2008). Microbiological quality of retail chesse made form raw thermizd or pasterurizd milk in the UK. Food Microbiology, 25: 304-312.

- Lovseth, A., Loncarevic, S. and Berdal, K.G. (2004). Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in Staphylococcal isolates. Journal of Clinical Microbiology, 42: 3869-3872.
- Monday, S.R. and Bohach, G.A. (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates. Journal of Clinical Microbiology, 37(10): 3411-3414.
- Pinto, B., Chenoll, E. and Aznar, R. (2005). Identification and typing of foodborne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. Systematic and Applied Microbiology, 28: 340-352.
- Rall, V.L.,Vieira, F.P., Rall, R., Vieitis, R.L., Fernandes, A.Jr., Candeias, J.M., *et al.* (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Veterinary Microbiology, 132(3-4): 408-13.
- Sauer, P., Sıla, J., Stosova, T., Vecerova, R., Hejnar, P., Vagnerova, I., *et al.* (2008). Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. Journal of Medical Microbiology, 57:403-410.

Prevalence of six genes encoding enterotoxins production of *Staphylococcus aureus* isolated from white-brined-cheese by multiplex PCR

Mahdavi, S.

1- Assistant Professor of Microbiology Department, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.
*Corresponding author email: S.mahdavi@iau-maragheh.ac.ir
(Received: 2013/12/5 Accepted: 2014/6/18)

Abstract

Isolation, identification and grouping of Staphylococcal enterotoxins in milk is of great importance since these toxins are considered as a major potential source of human illness. In this study, 22 coagulase positive strains of *Staphylococcus aureus* isolated from white brine cheese produced in rural areas of Maragheh, were assessed for the existence of six genes encoding enterotoxin synthesis using multiplex PCR. For this, extracted DNA was subjected to multiplex PCR for the presence of enterotoxin a, b, g, h, i and j genes. Amongst seg was the most frequent (8 strains) gene; meanwhile seb gene was not detected in any of the isolates. According to the results, 9 strains (40.9%) harbored the genes encoding enterotoxin production. Four strains (18.18%) contained more than one enterotoxin gene. The results of this study indicated that most of *Staphylococcus aureus* isolates in traditional cheeses have the potency to produce enterotoxin.

Key words: *Staphylocogccus aureus,* Enterotoxin, Cheese, Multiplex PCR