مجله پژوهش های بالینی دامپزشکی
JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۱۵۲-۱۴۵

شناسایی ژن‌های انتروتوکسین A و B در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام و شیر ورم پستان گاوداری‌های صنعتی استان تهران

سپیده ولی[۱]، فرهاد موسی خانی*[۲]، آریا بدیعی[۳]، علیرضا جمالی[۵]، سمیرا قلمبردزفولی[۴]

۱- گروه صنایع غذایی، واحد علوم تحقیقات استان کردستان - سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۴- آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی مبنا، کرج، ایران

۵- معاون فنی اداره کل دامپزشکی استان البرز

***نویسنده مسئول:** fmoosakhani@kiau.ac.ir

چکیده

شیر به عنوان یک غذای مغذی در نظر گرفته می‌شود زیرا حاوی چندین ماده مغذی مهم از جمله پروتئین‌ها و ویتامین‌ها است. در مقابل، شیر می‌تواند ناقل چندین باکتری پاتوژن همچون استافیلوکوکوس اورئوس باشد. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus) یکی از مهمترین عوامل مسمومیت غذایی (FP) در محصولات لبنی می‌باشد. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SE) عامل اصلی ایجاد مسمومیت غذایی می‌باشد که از تیپ‌های مختلفی تشکیل شده‌اند مهمترین آنها انتروتوکسین‌های تیپ A(SEA) و B(SEB) می‌باشد.

هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های انتروتوکسین A و B در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام و شیر ورم گاوداری‌های صنعتی استان تهران می‌باشد. در این تحقیق ۴۰ نمونه شامل ۲۰ نمونه شیر خام و ۲۰ نمونه شیر ورم پستان در شرایط استریل به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه‌ها از طریق روشهای باکتری شناسی مورد کشت و تشخیص قرار گرفت. باکتری‌های جداشده برای تشخیص ژن کد کننده SEA و SEB به وسیله آزمایشات PCR ارزیابی شد. نتایج آزمایش PCR نشان داد که از میان استافیلوکوک‌های جدا شده ۲۵% دارای ژن SEA، ۱۵% دارای ژن SEB هستند. از این روحرارت دادن هیچ تاثیری بر روی محصولات لبنی آلوده به انتروتوکسین و ورم معده که ممکن است در زمان کوتاه رخ بدهد، ندارد. در نتیجه PCR به عنوان یک روش سریع، حساس، اختصاصی و ارزان قیمت پیشنهاد می‌شود که می‌تواند جایگزین خوبی برای روش‌های قدیمی تشخیص SE باشد.

واژه‌های کلیدی: انتروتوکسین، استافیلوکوکوس اورئوس، PCR

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 5(3)145-152, 2014

Detection of Enterotoxin Genes A & B of Staphylococcus aureus strains isolated from raw milk and mastitic milk of dairy cattle herds of Tehran province

Sepideh Vali[1], Farhad Moosakhani[*2], Arya Badiei[3], Ali reza Jamali[5], Samira Ghalambor Dezfouli[4]

1. Department of food science, Science and Research of Kurdistan- Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

4. Diagnosis Veterinary laboratory-Mabna , Karaj, Iran.

5.Technical deputy of Alborz province veterinary directorate, Karaj, Iran

**** Corresponding author:*** **fmoosakhani@kiau.ac.ir**

Abstract

Milk is considered a nutritious food because it contains several important nutrients including proteins and vitamins. Conversely, it can be a vehicle for several pathogenic bacteria such as Staphylococcus aureus. 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.

The aim of the present study was detection of enterotoxin genes A&B of staphylococcus aureus strains isolated from raw milk of dairy cattle herds of Tehran province. In the current study, 40 samples of raw milk and mastitis milk 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.The PCR results showed that(%25) of Staphylococcus aureus isolates possessed the SEA gene,(%15) had the SEB. Therefor heating has no effect on dairy products contaminated by enterotoxins 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.

Key words: Enterotoxin, Staphylococcus aureus, PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس(Staphylococcus aureus) از مهمترین باکتری‌ها در بین عوامل مسمومیت در مواد غذایی و لبنی می‌باشد. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی عامل اصلی ایجاد مسمومیت غذایی می‌باشد که از تیپ‌های مختلفی تشکیل شده‌اند. مهمترین انها تیپ A(SEA) و B(SEB) می‌باشد. اعضای جنس استافیلوکوکوس دارای بیش از ۲۰ گونه می‌باشد که در زیستگاه‌های 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 گردوغبارهوا و آب‌های طبیعی منتقل می‌شوند(۹). برخی از گونه‌ها برای انسان و حیوان بیماری زا هستند و برخی دیگر در فساد مواد غذایی نقش دارند. استافیلوکوکوس اورئوس از جمله گونه‌های شاخصی است که علاوه بر بیماری زایی برای انسان در فساد مواد غذایی نیز نقش دارد و یکی از چهار عامل شایع و مهم در ایجاد مسمومیت غذایی می‌باشد(۱۲).

از نظر مقاومت به شرایط فیزیکی و شیمیایی تقریبا تمام سروتیپ‌های انتروتوکسین در مقابل حرارت و عوامل آنزیمی از جمله تریپسین موجود در دستگاه گوارش مقاومند، به جز 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 آنتی بادی دارد (۱۲،۴،۲). سروتیپ‌های A و B عامل اصلی گاستروانتریت می‌باشند.

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 در هر گرم ماده غذایی وجود داشته باشد، باکتری فرصت رشد و تولید انتروتوکسین می‌یابد (۱۲،۸).

به دلیل مقاومت انتروتوکسین به حرارت امکان ایجاد مسمومیت غذایی بعد از حرارت دهی نیز وجود دارد زیرا توکسین فعال باقی مانده و منجر به گاستروانتریت می‌گردد. در میان انتروتوکسین‌های باکتریایی SEB از اهمیت بیشتری برخوردار است. در تحقیقات مختلف مشخص گردیده است ۸۰-۱۵ درصد سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس که از منابع مختلف جدا می‌شود قادر به تولید انتروتوکسین می‌باشد(۱۱،۶،۱). شیر یک منبع مغذی و کامل می‌باشد.

شیر یک منبع غنی از کلسیم است که یکی از مهمترین ترکیبات معدنی و مغذی می‌باشد و سرشار از ویتامین‌ها و املاح است و چون یک منبع غذایی مهم است و آلودگی شیر منجر به آلودگی فرآورده‌های تولید شده از آن می‌شود بنابراین اولین قدم، تشخیص و کاهش آلودگی‌ها در شیر می‌باشد. یکی از این آلودگی‌ها استافیلوکوکوس اورئوس است که یکی از مهمترین عوامل مسمومیت در مواد غذایی و لبنی است. روش‌های مختلفی برای تشخیص قدرت انتروتوکسین زایی باکتری‌ها وجود دارد، روش PCR یک روش اختصاصی، حساس و سریع می‌باشد که در این مطالعه به شناسایی این عامل از طریق آزمایشات PCR پرداخته شده است.

مواد و روش کار

در این تحقیق نمونه‌ی شیر از گاوداری‌های مختلف به آزمایشگاه ارسال گردید. از نمونه‌ها کشت و جداسازی S.aureus صورت پذیرفت. سپس تعداد ۴۰ نمونه شامل ۲۰ نمونه شیر خام و ۲۰ نمونه شیر ورم به صورت تصادفی از ۲۰ گاوداری متفاوت اخذ و به لحاظ وجود و یا عدم وجود ژن‌های A و PCR,B گردید. جهت شناسایی و جداسازی S.aureus کشت بر روی محیط برد پارکر آگار صورت پذیرفت و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس از کلنی‌های مشکوک، تست‌های تاییدی از جمله تست کاتالاز، تست اکسیداز، تخمیر مانیتول و تست کوآگولاز صورت پذیرفت(۱۰،۷).

استخراج DNA از کلنی‌های تایید شده‌ی S.aureus با استفاده از کیت Qiagen و طبق دستور سازنده‌ی کیت صورت پذیرفت. جهت انجام واکنش زنجیره‌ی پلی مراز (PCR) مقدار ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بعلاوه‌ی

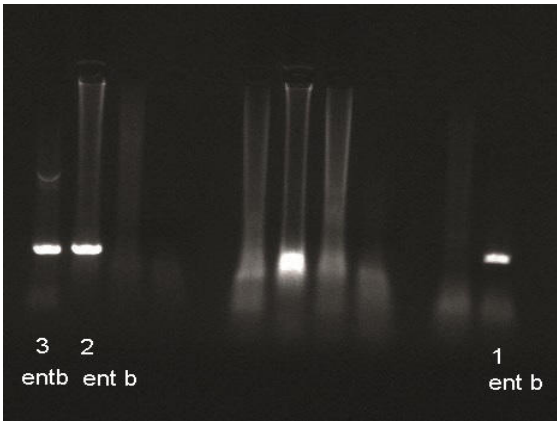
۲۰ میکرولیتر مستر میکس ساخته شده‌ی مجزا برای هر ژن (جدول ۱) طبق دستور کیت مربوطه (QIAGEN) مخلوط شده و در داخل دستگاه ترموسیکلر با برنامه حرارتی مشخص (جدول ۲) قرار داده شد. همچنین بجز نمونه ها، یک نمونه‌ی کنترل منفی و یک نمونه‌ی کنترل مثبت نیز مورد استفاده قرار گرفت. جهت شناسایی ژن‌های مورد نظر، محصول PCR از طریق الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت. سایز باند مورد نظر برای ژن SEA ۱۲۰ جفت باز و برای ژن SEB ۴۷۸ جفت باز می‌باشد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در طرح

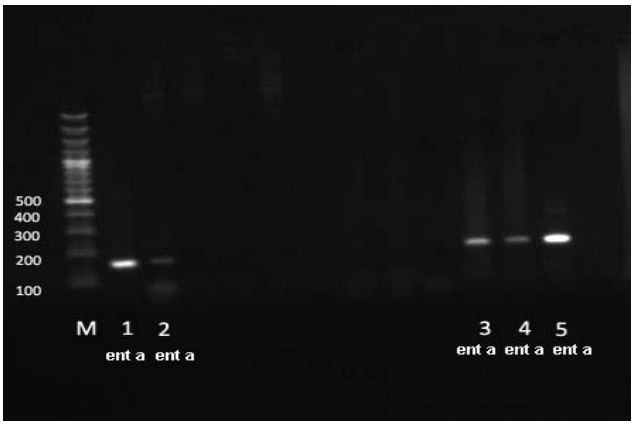
Gene	Primer	Sequence
Sea	SEA-1	ttggaaacggttaaaacg
	SEA-2	gaaccttcccatcaaaaaca
Seb	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg
	SEB-2	gcaggtactctataagtgcc

جدول ۲- شرح برنامه حرارتی مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر

	مراحل	دما	زمان
	Initial denaturation	94	3 min
Cycle 35x	Denaturation	94	30 sec
	Annealing	50	30 sec
	Extension	72	30 sec
	Final extension	72	5 min



تصویر ۱- نمونه مثبت برای ژن SEB. ستون‌های شماره گذاری شده ۲،۱و۳ باند مورد نظر ۴۷۸ جفت باز را نشان می‌دهد که نشانه مثبت بودن نمونه‌ها است. (۳ نمونه مثبت)



تصویر ۲- نمونه مثبت برای ژن SEB. ستون‌های شماره گذاری شده ۱،۲،۳،۴،۵ باند مورد نظر ۱۲۰ جفت باز را نشان می‌دهد که نشانه مثبت بودن نمونه‌ها است. (۵ نمونه مثبت)

یافته‌ها

نتایج آزمایش PCR نشان داد که از ۲۰ نمونه شیر خام آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس ۵ نمونه دارای توکسین A (۲۵%)، ۳ نمونه دارای توکسین B (۱۵%) و ۱ نمونه (۵%) دارای هر دو توکسین بودند.

جدول۳-۱ تعداد توکسین A و B در ۲۰ نمونه شیر خام آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس

نوع توکسین	تعداد در ۲۰ نمونه	درصد
توکسین A	۵	٪۲۵
توکسین B	۳	٪۱۵
توکسین AوB	۱	٪۵

نتایج PCR را با ۲۰ نمونه شیرگاو مبتلا به ورم پستان مورد مقایسه قرار دادیم. نتایج PCR شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان نشان داد که از بین ۲۰ نمونه شیر آلوده به ورم پستان تعداد (۶) نمونه دارای توکسین A، تعداد (۴) نمونه دارای توکسین B و (۹) نمونه دارای هر دو توکسین بودند.

جدول۳-۲ تعداد توکسین A و B در ۲۰ نمونه شیر ورم پستان آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس

نوع توکسین	تعداد در ۲۰ نمونه	درصد
توکسین A	۷	٪۳۵
توکسین B	۳	٪۱۵
توکسین A و B	۱	٪۵

بحث

استافیلوکوکوس‌ها باکتری‌های گرم مثبتی هستند که بطور وسیعی در طبیعت وجود دارند. اغلب گونه‌های این باکتری ساپروفیت و غیر بیماریزا هستند ولی تعدادی از انها برای انسان و حبوان بیماریزا هستند. این باکتری در غذا و لبنیات حضور دارند و از منابع مختلف وارد می‌شود.

Bennett در سال ۱۹۱۴ با آزمایشات نشان داد خوردن شیر آلوده به استافیلوکوکوس باعث مسمومیت و علائم آن می‌گردد.(۳) بعدها مشخص شد آنتروتوکسین‌ها (گروه SEA تا SEE) مهمترین عوامل ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی هستند و عوارض عمده آنها گاستروآنتریت می‌باشد. مطالعات زیادی در دنیا بر روی شیر و فراورده‌های لبنی حضور آنتروتوکسین A و B و ژن‌های آنها را در استافیلوکوکوس‌های این فراورده‌ها نشان داده است. در مطالعه‌ای در ایالت متحده آمریکا، ۶۹ درصد مسمومیت‌های غذایی ناشی از SEA و SEB بود. در سال ۲۰۱۰ Ertas و همکارانش در ترکیه بیشترین درصد ژن‌های جدا شده را نشان دادند.(۵) در مطالعات سالاری و همکارانش (۱۳۹۱) آنتروتوکسین A و B به عنوان مهمترین آنتروتوکسین‌ها از نمونه‌های بالینی در شهرستان‌های رفسنجان و کرمان شناسایی گردید. از آنجایی که آنتروتوکسین‌ها به حرارت مقاوم بوده و حتی پس از پاستوریزه نمودن شیر و فرآورده‌ها نیز از بین نمی‌روند باعث بروز مسمومیت به صورت اپیدمی در جمعیت‌های انسانی می‌شوند. با توجه به اهمیت مسمومیت‌های ناشی از این باکتری و فراوانی ژن‌های آنتروتوکسین A و B اقدام بهبررسی فراوانی این دو ژن در شیر خام دامداری‌های استان تهران شد.

نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که ژن‌های A و B در شیر خام گاوداری‌های استان تهران به ترتیب۲۵% و ۱۵% را شامل می‌شوند و در شیر ورم پستان به ترتیب ۴۰% و ۱۵% می‌باشد. فولادی و همکاران در سال ۱۳۸۸ بر روی ۱۰۰ نمونه مواد لبنی تهیه شده به روش سنتی در شهر تهران اقدام به ردیابی ژن‌های SEA و SEB به روش PCR در استافیلوکوکوس آرنوس نمودند. نتایج آنها نشان داد ۱۵/۶ درصد دارای ژن SEA و۹/۳ درصد دارای ژن SEB و۶/۲ درصد هر دو ژن SEA و SEB را دارا هستند.

Casman و همکاران در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که قدرت آنتروتوکسین زایی سویه‌های استافیلوکوکی جدا شده از منابع کلینیکی حدود ۴۷ درصد و سویه‌های غیر کلینیکی حدود ۳۱ درصد گز ارش نمودند.(۳) Gilmor و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که حدود ۳۵ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از شیر بزهای سالم و حدود ۸۳-۷۰/۴ درصداز سویه‌های جدا شده از شیر بزها و گوسفندان مبتلا به ورم پستان، توانایی تولید آنتروتوکسین دارند. گودرزی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در مطالعه‌ی گسترده‌ای طی ۵ ماه بر روی ۱۵۰ نمونه از شهر تهران اقدام به شناسایی ژن‌های آنتروتوکسین A – E و TSST-1 نمودند. نمونه‌ها شامل: ۷۰ نمونه کلینیکی از بیمارستان‌های شهر تهران، ۳۰ نمونه از سواپ بینی افراد سالم، ۵۰ نمونه از مواد غذایی غیر پاستوریزه شامل ۳۰ نمونه لبنیات، ۷ نمونه شیرینی جات، ۷ نمونه گوشت خام و ۶ نمونه سبزی جات بود. نتایج این بررسی ۳۲/۰۷ درصد ژن sea و۷۳/۵۸

درصد ژن seb را نشان داد. به طورکلی در این مطالعه ۲۰ استافیلوکوکوس آرئوس از مواد لبنی خام جدا شد که ۲۴/۵۳ درصد حاوی ژن‌های آنتروتوکسین بود.

نتایج بدست آمده برای ژن SEA در این مطالعه در مقایسه با سایر تحقیقات اختلاف چندانی نداشته ولی در مورد ژن SEB نتایج متفاوت با سایر تحقیقات انجام شده می‌باشد. بر خلاف سایر مطالعات که فراوانی ژن SEB بیشتر گزارش شده، در این مطالعه فراوانی ژن SEA بیشتر بود. دلایل مطرح شده توسط محقق برای این اختلاف به شرح ذیل می‌باشد:

- سطح بهداشتی
- میزان ورم پستان در گاوداریها
- پرسنل ناقل باکتری که درپروسه‌ی تولید دخالت دارند
- سیستم حمل و نقل و.....

Zschock و همکاران (۲۰۱۰) در آلمان اقدام به جداسازی استافیلوکوکوس آرئوس از نمونه شیر ورم پستان نمودند و نشان دادند که ۳۶/۲ % از سویه‌های جدا شده دارای ژن‌های آنتروتوکسین می‌باشند.(۱۵)

Ranpeck و همکارانش در کره نشان دادند که نمونه‌های کلینیکی ۴ برابر نمونه‌های غیر کلینیکی ژن‌های آنتروتوکسین را دارا هستند (حداقل یک ژن).

به طور کلی در نتایج این تحقیق فراوانی ژن SEA در شیر ورم پستان گاوها بیشتر بود که با سایر مطالعات مطابقت داشت.

نتیجه گیری و پیشنهادات:

بر اساس نتایج تحقیق ما و سایر تحقیقات فراوانی ژن‌های آنتروتوکسین در استافیلوکوکوس آرئوس‌های جدا شده از شیر و فرآورده‌ها نسبتا بالاست و با توجه به مقاوم به حرارت بودن و ایجاد مسمومیت‌های گاستروآنتریتی اقدام جهت بررسی بیشتر و به ویژه ردیابی و شناسایی آنتروتوکسین‌ها در شیر خام تحویلی کارخانه‌ها و فرآورده‌های لبنی ضروری است. موارد زیر به کاهش خطر وجود استافیلوکوکوس آرئوس و تولید آنتروتوکسین‌ها موثر خواهد بود:

۱- شناسایی گاوهای مبتلا به استافیلوکوکوس آرئوس، درمان یا حذف آنها از جمعیت گاوهای شیر ی.

۲- رعایت اصول بهداشتی در زمان شیر دوشی به ویژه دست کارگران و وسایل شیر دوشی و ضد عفونی مناسب در شیر دوشی.

۳- نگهداری مناسب شیر خام در گاوداری و در زمان انتقال به کارخانه.

۴- مطالعه‌ی بیشتر بر روی فرآورده‌های لبنی، تولید و بررسی استانداردهای آن.

References

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. LettApplMicrobiol. 2006 Apr; 42(2): 315-20.

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.

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

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

Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins in Sheep Cheese and Dairy Desserts by Multiplex PCR Technique. Int J Food Microbiol 2010 Aug 15;142(1-2):74-7.

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 MicrobiolLett. 2005 Feb; 243(2): 447-54.

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

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

Le Loir YL, Baron F, Gautier M. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genet Mol Res. 2003 Mar; 2(1): 63-73.

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.

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 MicrobiolLett. 2005 May; 246(2): 191-8.

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

Peck KR, Baek JY, Song JH, Ko KS. Comparison of Genotypes and Enterotoxin Genes Between Staphylococcus aureus Isolates from Blood and Nasal Colonizers in a Korean Hospital. J Korean Med Sci 2008,24(4):585-91.

Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM, Watanabe MT, FernandesJrA, Rall R, Silva MG, Araújo Jr JP. Detection of Enterotoxin Genes of Staphylococcus sp Isolated from Nasal Cavities and Hands of Food Handlers. Braz J Microbiol 2010;41(1):59-65.

Zschöck M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J, Hamann HP. Detection of Genes for Enterotoxins (ent) and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (tst) in Mammary Isolates of Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction. Int Dairy J 2000;10(8):569-574.