

## بررسی شیوع جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس تولید کننده انتروتوکسین در نمونه‌های مخازن جمع آوری شیر در شهر ماکو

محمد رضا صادقی<sup>\*۱</sup>

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و علوم صنایع غذایی،

دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو، ماکو، ایران

تاریخ پذیرش: ۲۰ اردیبهشت ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۶ دی ۱۳۹۲

### چکیده

بیماری‌های ناشی از مواد غذایی یکی از نگرانی‌های اصلی سازمان غذا و دارو و سازمان بهداشت جهانی محسوب می‌شود. تا به امروز بیش از ۲۵۰ نوع بیماری مرتبط با مواد غذایی توصیف شده و باکتری‌ها مسئول دو سوم موارد این بیماری‌ها هستند. یکی از شایع‌ترین بیماری‌های ناشی از مواد غذایی، مسمومیت غذایی باکتریال است که معمولاً با مصرف مواد غذایی آلوده به باکتری‌های توکسین‌زا مرتبط است. در بین باکتری‌های عامل مسمومیت غذایی، استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین عامل مسمومیت غذایی در دنیا محسوب می‌شود. شیر و محصولات لبنی شایع‌ترین مواد غذایی مرتبط با مسمومیت غذایی استافیلوکوکی هستند. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیرگاو و گوسفند شهر ماکو انجام شد. در این مطالعه در مجموع ۱۷۸ نمونه شیر شامل ۹۲ نمونه شیرگاو و ۸۶ نمونه شیرگوسفند از مخازن جمع‌آوری شیر نمونه‌گیری شد. ۷۶ جدایه از نمونه‌های شیر، به ترتیب با روش‌های آگلوتیناسیون لاکتکس معکوس (RPLA) و PCR چندگانه از نظر تولید انتروتوکسین و حضور ژن‌های مرتبط مورد آزمایش قرار گرفتند. به ترتیب از ۴۴ و ۳۲ جدایه از نمونه‌های شیرگاو و گوسفند، ۱۹ (۴۳/۱٪) و ۱۳ (۴۰/۶٪) جدایه تولیدکننده انتروتوکسین بودند. SEA، SED و SEC شایع‌ترین توکسین‌های شناسایی شده در تمامی جدایه‌ها بود. شیوع انتروتوکسین‌های کلاسیک و ژن‌های مربوطه در هر دو روش RPLA و Multiplex PCR تطابق ۹۱/۱٪ را در تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس آزمایش شده نشان می‌دهد. عدم تطابق در دو جدایه SEA مثبت که فاقد توانایی تولید SEA بودند، و جدایه‌ای با توانایی تولید SEA/SEC که فقط دارای ژن sec بود، مشاهده شد. این مطالعه حاکی از شیوع بالای جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیرگاو و گوسفند شهر ماکو می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، تولید کننده انتروتوکسین، مخازن جمع‌آوری شیر، ماکو

\* نویسنده مسئول: محمد رضا صادقی

آدرس: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و علوم صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو، ماکو، ایران. تلفن: ۰۴۶۲۳۲۷۹۹۰۰

پست الکترونیک: phdmohammadreza@gmail.com

## مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس شایع ترین عامل مسمومیت غذایی در انسان، و یکی از مهمترین عوامل سببی تورم پستان در گاوها می باشد (۴ و ۱۳). استافیلوکوکوس اورئوس شیر را از طریق ترشح مستقیم از غدد پستانی دچار تورم بالینی یا بدون علامت استافیلوکوکی و یا از طریق آلودگی با منابع دیگر، آلوده می کند. شیر و محصولات لبنی حاصل از شیر، عمده ترین مواد غذایی مرتبط با مسمومیت غذایی استافیلوکوکی هستند (۱۲). شایع ترین انتروتوکسین های استافیلوکوکی مرتبط با مسمومیت غذایی استافیلوکوکی شامل انواع SEA، SEB، SEC، SED و SEE می باشد که تحت عنوان انتروتوکسین های کلاسیک توصیف شده اند (۷). در دهه ۱۹۷۰ انتروتوکسین های استافیلوکوکی جدیدی تحت عنوان انتروتوکسین های غیر کلاسیک شامل SEG، SEH، SEI و SEJ نیز گزارش شده و ژن های مربوطه نیز شناسایی و توصیف شده اند (۳۱). اخیراً ژن های جدیدی از انتروتوکسین های استافیلوکوکی شامل *sek*، *sel*، *sem*، *sen*، *seo*، *sep*، *seq*، *ser* و *seu* نیز شناخته شده اند (۲۰)، اما نقش انتروتوکسین های غیر کلاسیک و ژن های اخیراً شناسایی شده در ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بخوبی مشخص نشده است (۸). انتروتوکسین های استافیلوکوکی A، B، C، D، E، مسئول ۹۵٪ اپیدمی های مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بوده و انتروتوکسین های استافیلوکوکی جدیداً توصیف شده ممکن است با ۵٪ موارد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی مرتبط باشند (۶). اما میزان شیوع جدایه های تولید کننده انتروتوکسین، و همچنین شایع ترین تیپ های سرولوژیکی مربوط به انتروتوکسین های شناسایی شده در کشورها و مناطق مختلف، در بین

مطالعات متعددی که بر روی نمونه های شیر گاو و گوسفند صورت گرفته، بسیار متفاوت است (۲۲، ۲۷، ۲۸ و ۲۹). تشخیص مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، براساس علائم بالینی و تشخیص سم در مواد غذایی می باشد (۱۷). چندین کیت تجاری بر اساس روش های ایمنونواسی شامل الایزا، ایمونودیفیوژن، آگلوتیناسیون لاتکس از جمله Staphylococcal Enterotoxin-Reverse Passive latex Agglutination (SET-RPLA)، بصورت روتین برای تشخیص انتروتوکسین های استافیلوکوکی مورد استفاده قرار گرفته است. اما این روش ها فقط قادر به تشخیص انتروتوکسین های کلاسیک A-E بوده و حساسیت پایینی دارند. اما پیشرفت های اخیر در زمینه تکنیک های مولکولی و در دسترس بودن اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن های انتروتوکسین، منجر به استفاده معمول از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز Polymerase Chain Reaction (PCR) برای تشخیص انواع انتروتوکسین های استافیلوکوکی شده است (۱۷). شیر سوسترای خوبی برای رشد استافیلوکوکوس اورئوس و تولید انتروتوکسین می باشد. علاوه بر این انتروتوکسین های مقاوم به حرارت استافیلوکوکی فعالیت بیولوژیک خود را حتی پس از پاستوریزاسیون حفظ کرده و حتی موارد متعددی از مسمومیت غذایی ناشی از مصرف شیر پاستوریزه شده و شیر خشک بویژه در نوزادان گزارش شده است (۳). با توجه به اهمیت این مسئله در سلامت انسان، انجام مطالعات وسیع، به منظور تخمین شیوع جدایه های انتروتوکسینژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی خصوصاً شیر و محصولات لبنی ضروری است. با توجه به مطالب مذکور، این مطالعه به منظور بررسی شیوع جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس و جدایه های تولید کننده

گلیسرول در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۹).

### تشخیص جدایه‌های انتروتوکسینیک با روش SET-RPLA

تعداد ۷۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس پس از تعیین هویت اولیه، با استفاده از کیت SET-RPLA ساخت شرکت OXOID (ایالات متحده) Staphylococcal Enterotoxin Reverse Passive ( Latex Agglutination) از نظر توانایی تولید انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور تمامی جدایه‌ها در ۱۰ میلی لیتر محیط Brain heart infusion broth (OXOID) کشت داده شدند و انکوباسیون بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد همراه با Shaking تحت شرایط هوازی انجام شد. کشت‌های مایع در مرحله بعد از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتری (Nalgen labware, NY, USA) عبور داده شد و عصاره‌های بدست آمده با استفاده از کیت SET-RPLA (OXOID) مطابق با توصیه‌های شرکت سازنده برای تشخیص SEA, SEB, SEC و SED مورد آزمایش قرار گرفتند. این روش بر اساس آگلوتیناسیون ذرات لاتکس حساس شده با آنتی‌بادی‌های ضدانتروتوکسین می باشد (۱۸).

### تشخیص ژن‌های انتروتوکسین با استفاده از روش Multiplex-PCR

استخراج DNA مطابق با روش Cremonesi و همکاران (۲۰۰۶) از یک میلی لیتر کشت مایع شبانه Brain heart infusion broth حاوی حدود یک تا سه بیلیون سلول (شمارش در محیط بردپارکر حاوی فیبرینوژن پلاسمای خرگوش) انجام شد (۱۰). مراحل استخراج DNA شامل دو بار شستشو با سالیین استریل و

انتروتوکسین و توزیع انواع انتروتوکسین‌های کلاسیک و ژن‌های sei seh seg see sed sec seb sea و sei در نمونه‌های شیر گاو و گوسفند شهر ماکو در نظر گرفته شد.

### مواد و روش کار

#### جمع آوری نمونه و شناسایی جدایه‌ها

در این مطالعه هشت دامداری در حومه شهر ماکو واقع در استان آذربایجان غربی مورد مطالعه قرار گرفتند. حجم ۱۵۰ میلی لیتر از ۱۷۸ تانک انتقال شیر، مشتمل بر ۹۲ تانک شیر گاو و ۸۶ تانک شیر گوسفند، در کیسه‌های پلاستیکی استریل جمع آوری و تحت شرایط سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از رسوب حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۳۵۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۵ دقیقه، بر روی محیط بردپارکر (OXOID) حاوی ۵٪ امولسیون (OXOID) Egg yolk tellurite کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد تحت شرایط هوازی، کلونی‌های سیاه با هاله شفاف بر روی محیط بردپارکر آگار به لوله‌های حاوی نوترینت برات انتقال داده شد. پس از انکوباسیون بمدت ۲۴ ساعت تحت همان شرایط، ۲۵ میکرولیتر از هر لوله بر روی محیط مانیتول سالت آگار (OXOID) کشت داده شد. کلونی‌های مانیتول مثبت (زرد رنگ) در مرحله بعد بر روی محیط بلاد آگار خون گوسفند، به منظور رنگ آمیزی گرم، مشاهده واکنش همولیز، تست‌های کاتالاز و کوآگولاز (با استفاده از پلاسمای تازه خرگوش با روش Tube test) کشت داده شد. کلونی‌هایی که بعنوان استافیلوکوکوس اورئوس مورد شناسایی قرار گرفتند، پس از کشت در محیط مایع Brain heart infusion broth (OXOID) حاوی ۱۵٪

روش SET-RPLA به منظور شناسایی و تایید انتروتوکسین‌ها در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مقایسه قرار گرفت.

## نتایج

### نتایج تشخیص جدایه‌های انتروتوکسیژنیک با روش SET-RPLA

در مجموع ۷۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از کشت ۱۷۸ نمونه شیر شامل ۴۴ جدایه از نمونه‌های شیر گاو و ۳۲ جدایه از نمونه‌های شیر گوسفند بدست آمد. توانایی تولید انواع انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی با استفاده از کیت SET-RPLA ارزیابی شد که براساس آن ۴۲/۱٪ از کل جدایه‌ها (۳۲ از ۷۶ جدایه) شامل ۴۳/۱٪ جدایه‌های شیر گاو و ۴۰/۶٪ جدایه‌های شیر گوسفند دارای توانایی تولید انتروتوکسین بودند. شیوع و منشأ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک و تیپ‌های سرولوژیکی انتروتوکسین‌های مربوطه در جدول ۲ درج شده است. نتایج SET-RPLA نشان می‌دهد که SEA شایع‌ترین انتروتوکسین شناسایی شده در بین تمامی جدایه‌ها (۲۰ از ۷۶ جدایه، ۲۶/۳٪) می‌باشد. پس از SEA به ترتیب، SED (۱۰ جدایه، ۱۳/۱٪) و SEC (۷ جدایه، ۹/۲٪)، شایع‌ترین انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در بین جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بودند. بر طبق نتایج SET-RPLA سه جدایه انتروتوکسین‌های SEA و SED، یک جدایه انتروتوکسین‌های SEC و SED و یک جدایه انتروتوکسین‌های SEA و SEC را بطور همزمان تولید می‌کردند. در این تست هیچ جدایه تولید کننده SEB شناسایی نشد. بر این اساس، شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس از مجموع ۷۶ جدایه، ۴۲/۱٪ بود که شامل ۴۳/۱٪

سانتریفیوژ بمدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد، لیز باکتری با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز (گوانیدین تیوسیانات ۳ مولار، ۲۰ میلی مول Tris-HCL، ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر Triton X-100، ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر DL-Binding solution (dithiothreitol)، و ۲۰۰ میکرولیتر (محلول ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر Silica در بافر لیز) و انکوباسیون بمدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و سانتریفیوژ بمدت ۳۰ ثانیه در ۴۵۰۰ g، شستشوی پلت با بافر شستشو (اتانول ۲۵٪، ایزوپروپانول ۲۵٪، ۱۰ میلی مول NaCl، ۱۰ میلی مول Tris-HCL) و سانتریفیوژ بمدت ۳۰ ثانیه در ۴۵۰۰ g خشک کردن پلت بمدت ۱۰ دقیقه و اضافه کردن Elution buffer (۱۰ میلی مول Tris-HCL و ۱ میلی مول EDTA) و انکوباسیون در ۶۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ دقیقه و سانتریفیوژ بمدت ۵ دقیقه در ۴۵۰۰ g و انتقال supernatant به میکروتیوپ بود. بطور میانگین ۱۰ میکروگرم DNA از سوسپانسیونی با غلظت  $10^8$  Cfu/ml بدست آمد. پرایمرهای لازم برای تکثیر اختصاصی ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی (۹ ژن) شامل sei, seh, sei, seh, seg, see, sed, sec, seb, sea در جدول ۱ لیست شده است (۲۱). تکثیر DNA با استفاده از Icyler (Bio-Red, Munich, Germany) و Platinum Taq DNA Polymerase شرکت Invitrogen انجام شد. تکثیر DNA در ۳۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد بمدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۶۰ ثانیه با تکثیر نهایی در ۷۲ درجه بمدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۲۱). محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگاروز با استفاده از ترنس لومیناتور نمایان شدند. در این مطالعه نتایج روش PCR چندگانه با نتایج مربوط به

تطابق فقط در دو جدایه *sea* مثبت که از نظر SEA منفی بودند و یک جدایه SEA و SEC مثبت که فقط دارای ژن *sec* بود، دیده شد. ۳۱ جدایه از ۳۴ جدایه (۹۱/۱٪) دارای ژن انتروتوکسین کلاسیک با روش SET-RPLA مورد شناسایی قرار گرفت. در این بررسی ژن های *seb* و *see* در هیچ جدایه‌ای مورد شناسایی قرار نگرفت. نتایج مربوط به شیوع و نوع ژن های مربوط به انتروتوکسین های استافیلوکوکی در جدایه های نمونه های شیر گاو و گوسفند در جدول ۳ و الکتروفورز محصولات PCR مربوط به تکثیر اختصاصی ژن های انتروتوکسین در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدایه های شیر گاو (۱۹ جدایه از ۴۴) و ۴۰/۶٪ جدایه های شیر گوسفند (۱۳ جدایه از ۳۲) می باشد.

### نتایج تکثیر ژن های انتروتوکسین با روش PCR چندگانه

در این تحقیق، تمامی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس از نظر حضور ژن های انتروتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی ۳۲ جدایه تولید کننده انتروتوکسین کلاسیک بر اساس روش PCR چندگانه دارای ژن انتروتوکسین های کلاسیک بودند. نتایج مربوط به شیوع تیپ های انتروتوکسین های کلاسیک استافیلوکوکی و ژن های مربوطه که با استفاده از روش های SET-RPLA و PCR چندگانه مورد ارزیابی قرار گرفته بودند، تطابق ۹۱/۱٪ را نشان می دهند. عدم

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی ژن های انتروتوکسین استافیلوکوکی

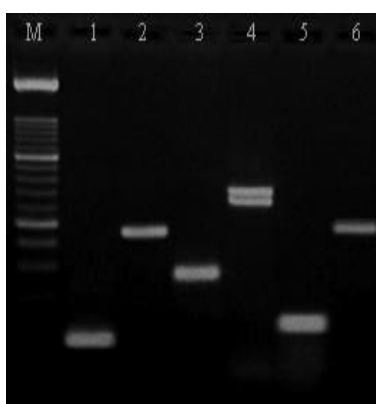
ژن	پرایمر	توالی پرایمر	اندازه امپلیکون	منابع
<i>sea</i>	<i>sea-F</i>	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	۱۰۲	Mehrotra et al.2000
	<i>sea-R</i>	CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG		
<i>seb</i>	<i>seb-F</i>	GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC	۱۶۴	Mehrotra et al.2000
	<i>seb-R</i>	CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG		
<i>sec</i>	<i>sec-F</i>	AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG	۴۵۱	Mehrotra et al.2000
	<i>sec-R</i>	CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG		
<i>sed</i>	<i>sed-F</i>	CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG	۲۷۸	Mehrotra et al.2000
	<i>sed-R</i>	ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC		
<i>see</i>	<i>see-F</i>	AGG TTT TTT CAC AGG TCA TCC	۲۰۹	Mehrotra et al.2000
	<i>see-R</i>	CTT TTT TTT CTT CGG TCA ATC		
<i>seg</i>	<i>seg-F</i>	TGC TAT CGA CAC ACT ACA ACC	۷۰۴	MacLauchlin et al. 2000
	<i>seg-R</i>	CCA GAT TCA AAT GCA GAA CC		
<i>seh</i>	<i>seh-F</i>	CGA AAG CAG AAG ATT TAC ACG	۴۹۵	MacLauchlin et al. 2000
	<i>seh-R</i>	GAC CTT TAC TTA TTT CGC TGT C		
<i>sei</i>	<i>sei-F</i>	GAC AAC AAA ACT GTC GAA ACT G	۶۳۰	MacLauchlin et al. 2000
	<i>sei-R</i>	CCA TAT TCT TTG CCT TTA CCA G		
<i>sej</i>	<i>sej-F</i>	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG	۱۴۲	Mehrotra et al.2000
	<i>sej-R</i>	CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGC AC		

جدول ۲- شیوع جدایه های انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده با روش SET-RPLA

منبع	تعداد نمونه	تعداد ایزوله	ایزوله های انتروتوکسینیک	SEA n (%)	SEB n (%)	SEC n (%)	SED n (%)	SEA/SEC n (%)	SEA/SED n (%)	SEC/SED n (%)
شیر خام گاو	۹۲	۴۴	۱۹(۴۳/۱)	۹(۲۰/۴)	۰/۰	۳(۶/۸)	۳(۶/۸)	۱(۲/۲۷)	۲(۴/۵)	۱(۲/۲۷)
شیر خام گوسفند	۸۶	۳۲	۱۳(۴۰/۶)	۷(۲۱/۸)	۰/۰	۲(۶/۲۵)	۳(۹/۳۷)	۰/۰	۱(۳/۱۲)	۰/۰
مجموع	۱۷۸	۷۶	۳۲(۴۲/۱)	۱۶(۲۱)	۰/۰	۵(۶/۵۸)	۶(۷/۹)	۱(۱/۳)	۳(۳/۹)	۱(۱/۳)

جدول ۳- توزیع ژن های انتروتوکسین های استافیلوکوکی در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس

منبع	تعداد نمونه	تعداد ایزوله	شیوع ژن های انتروتوکسین های کلاسیک												
			Sea	seb	sec	sed	see	sea/sec	sea/sed	sec/sed	seg	seh	seg/sei	sei/sej	
شیر خام گاو	۹۲	۴۴	۳۳	۱۱	۰	۴	۳	۰	۰	۲	۱	۹	۱	۰	۰
شیر خام گوسفند	۸۶	۳۲	۲۲	۷	۰	۲	۳	۰	۰	۱	۰	۴	۳	۱	۱
مجموع	۱۷۸	۷۶	۵۵	۱۸	۰	۶	۶	۰	۰	۳	۱	۱۳	۴	۱	۰



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن های انتروتوکسین بر روی ژل آگاروز. چاهک M: 100 bp DNA ladde؛ چاهک های ۱-۳: جدایه های مثبت برای ژن های *sea*، *seb* و *sec*؛ چاهک ۴: جدایه مثبت برای هر دو ژن *seg* و *seh*؛ چاهک های ۵-۶: جدایه های مثبت برای ژن های *seg/sei* و *sei/sej*

## بحث

غذایی استافیلوکوکی محسوب می شود. در این مطالعه فراوانی کلی استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های بررسی شده نسبتاً بالا (۴۲/۷٪) بود که شامل ۴۷/۸٪ در نمونه های شیر گاو و ۳۷/۲٪ در نمونه های شیر گوسفند می باشد. این میزان آلودگی بطور قابل توجهی بالاتر از آلودگی نمونه های شیر گاو (۱۶٪) و گوسفند (۱۰٪) استان فارس می باشد که اخیراً توسط رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش شده است (۲۲). همچنین در این مطالعه شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های شیر گاو شهر اصفهان ۲۳/۴٪ گزارش شده است که پایین تر از میزان شیوع آن در شهر ماکو می باشد (۲۲). میزان شیوع بالای استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه های شیر گاو و گوسفند شهر ماکو نسبت به

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی یکی از شایع ترین بیماری های مرتبط با مواد غذایی است که بعلاوه شیوع گسترده استافیلوکوکوس اورئوس و توانایی بسیاری از سویه های آن در سنتز انتروتوکسین های مختلف می باشد. آلودگی محصولات لبنی با استافیلوکوکوس اورئوس نتیجه ای از حضور این باکتری در مواد اولیه خام بویژه شیر است (۵ و ۲۳). اهمیت این مسئله بویژه در کشورهایی با تولید انبوه محصولات لبنی از جمله پنیر و سایر محصولات لبنی، بسیار بالاست (۳۰). در آذربایجان، پنیر گوسفند یک محصول بومی و سنتی محسوب می شود که عمدتاً از شیر پاستوریزه نشده تهیه شده و در نتیجه بعنوان منبع مهمی برای مسمومیت

با شیوع ۵۰٪ SEA، نشان دهنده شیوع بالای جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین و همچنین شیوع بالای SEA در نمونه‌های شیر گاو استان فارس نسبت به شهر ماکو می‌باشد. همچنین میزان شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیر گاو در این مطالعه بطور قابل توجهی پایین تر از نتایج ارائه شده توسط Morandi و همکاران (۲۰۰۷) مبنی بر ۳۹ جدایه تولید کننده انتروتوکسین از ۷۱ جدایه شیر گاو (۵۵٪) و با شیوع بالای SEA می‌باشد (۱۶). بر اساس مطالعات قبلی، شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های مواد غذایی مختلف مثل شیر، محصولات تهیه شده از شیر، گوشت و تخم مرغ در کشورهای مثل برزیل، آمریکا، سوئد، کره جنوبی، هلند، اسلوواکی، چین، فرانسه، سوئیس و ژاپن بسیار متفاوت بوده و از ۴/۷٪ تا ۷۷/۴٪ متغیر است (۲۹، ۲۷، ۲۸، ۲۶، ۲۴، ۱۹، ۱۱). این شیوع برای نمونه‌های شیر نیز در بین مطالعات مختلف متفاوت می‌باشد. در ایران نیز گزارش‌های متفاوت و محدودی از شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی مختلف وجود دارد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از متفاوت بودن منابع آلودگی در مناطق مختلف، منشا اکولوژیکی سویه‌ها، حساسیت روش‌های تشخیصی، ژنهای مورد مطالعه و تعداد نمونه باشد. بر طبق نتایج این تحقیق، انتروتوکسین‌های SEA، SEC و SED، شایع‌ترین توکسین‌های شناسایی شده در جدایه‌های شیر خام می‌باشند که با نتایج مربوط به مطالعات Balaban و همکاران (۲۰۰۰) و رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد (۴ و ۲۲). بنابراین نتایج این مطالعه حاکی از حضور استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیر خام گاو و گوسفند شهر ماکو بوده و

استان فارس و اصفهان می‌تواند بعلت شیوع بالای تورم پستان بدون علامت در گاو و گوسفندان شهر ماکو باشد. بر طبق نتایج این تحقیق شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیر گاو شهر ماکو پایین تر از شیوع آن در نمونه‌های شیر گاو کشور نروژ (۷۵٪) می‌باشد که توسط Jorgensen و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شده است (۱۲). در این مطالعه تولید انتروتوکسین در ۴۰/۶٪ جدایه‌های شیر خام گوسفند با شیوع بالای SEA (۲۱/۸٪) مشاهده شد. نتایج متفاوتی توسط Morandi و همکاران (۲۰۰۷) مبنی بر شیوع ۵۳٪ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیر خام گوسفند، با شیوع ۱۰۰٪ SEC گزارش شده است (۱۶). اما Adwan و همکاران (۲۰۰۵) گزارشی مبنی بر شیوع ۴۴/۲٪ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک (۲۳) جدایه از ۵۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس) را در نمونه‌های شیر خام گوسفند با شیوع بالای SEB (۶۰/۹٪) ارائه داده اند که از لحاظ شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک در نمونه‌های شیر گوسفند با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱). در تحقیق دیگری که توسط رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) در استان فارس انجام شد، میزان شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک در نمونه‌های شیر گوسفند ۷۵٪ با شیوع ۱۰۰٪ SEC، گزارش شده است که نشان دهنده شیوع بالای سروتیپ‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی تیپ C در بین جدایه‌های شیر گوسفند استان فارس نسبت به ماکو می‌باشد (۲۲). در تحقیق حاضر میزان شیوع جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیر گاو ۴۳/۱٪، با شیوع SEA به میزان ۲۰/۴٪ بدست آمد. مقایسه این نتایج با یافته‌های حاصله در تحقیق رحیمی و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر شیوع ۷۵٪ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک

تاکید کننده خطر بالقوه مسمومیت غذایی در مصرف کنندگان محصولات لبنی بویژه در غیاب روش‌های بهداشتی و ممانعت کننده از تولید انتروتوکسین می‌باشد. در این مطالعه ارزیابی تولید انتروتوکسین‌های I, H, G و J، بعلت نبود روش‌های ایمنونواسی تجاری برای انتروتوکسین‌های غیر کلاسیک انجام نشد. اما در روش PCR ژن‌های مربوطه شناسایی شد. در این مطالعه ارتباط نزدیکی بین منشأ جدایه‌های انتروتوکسیژنیک و نوع انتروتوکسین تولید شده دیده نشد. طوری که شیوع SEA در بین جدایه‌های شیر گاو و گوسفند تفاوت قابل توجهی نشان نمی‌دهد. این در حالی است که در مطالعات مشابه، SEA در بین جدایه‌های شیر گوسفند و SEC در جدایه‌های شیر گاو، شیوع بیشتری نشان می‌دهند (۲، ۱۸ و ۲۵).

در این مطالعه ۵۵ جدایه از ۷۶ جدایه (۷۲/۳٪) استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های شیر خام دارای ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی بودند که شامل ۳۳ جدایه شیر گاو و ۲۲ جدایه شیر گوسفند می‌باشد. ژن‌های انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی در تمامی جدایه‌های تولید کننده انتروتوکسین بجز یک جدایه SEA/SEC مثبت که فقط دارای ژن *sec* بود، تشخیص داده شد. ژن‌های مربوط به انتروتوکسین‌های غیر کلاسیک به تعداد یک ژن یا ترکیبی از دو ژن مختلف مورد شناسایی قرار گرفت. اما با توجه به اینکه تمامی روش‌های ایمنونواسی که بصورت تجاری در دسترس هستند، صرفاً برای تشخیص انتروتوکسین‌های کلاسیک طراحی شده‌اند، امکان بررسی توانایی تولید آنها در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس وجود نداشت. حضور ژن-های انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی در تمامی جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس

اورئوس با روش PCR مورد تایید قرار گرفت. دلیل اصلی عدم تطابق مشاهده شده بین نتایج SET-RPLA و PCR در مورد سه جدایه ممکن است حساسیت پایین روش SET-RPLA، تغییر پذیری توالی ژن‌های انتروتوکسین، احتمال وجود انتروتوکسین‌های ناشناخته با واکنش سرولوژیک متقاطع در روش‌های ایمنولوژیک و عدم وجود ارتباط قطعی بین حضور ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی و بیان آن و یا بیان انتروتوکسین در سطوح بسیار پایین باشد (۱۴). جدایه‌هایی از استافیلوکوکوس اورئوس که دارای سطوح معینی از واکنش متقاطع ایمنولوژیک با SEA هستند، اما هیچ ژنی بر اساس روش PCR در آنها شناسایی نشده، توسط Jorgensen و همکاران (۲۰۰۵) و همچنین MacLauchlin و همکاران (۲۰۰۰) در محصولات لبنی گزارش شده‌اند (۱۲ و ۱۵). در این مطالعه ژن *see* و *seb* در هیچیک از جدایه‌ها تشخیص داده نشد که از این نظر با نتایج مطالعات Jorgensen و همکاران (۲۰۰۵) و Morandi و همکاران (۲۰۰۷) هم خوانی دارد (۱۲ و ۱۶).

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی بعنوان یک مسئله مهم در بهداشت و سلامت جامعه مطرح است. مدل‌های متعددی به منظور پیش بینی الگوی رشد و تولید انتروتوکسین در استافیلوکوکوس اورئوس در صنایع غذایی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. فاکتورهای متعددی بر رشد و تولید انتروتوکسین در این باکتری تاثیرگذار بوده و به همین دلیل شناسایی و ارزیابی این فاکتورها نیاز به مطالعات بیشتر را توجیه می‌کند. نگهداری مناسب مواد غذایی عامل مهمی در جلوگیری از مسمومیت غذایی است. مطالعه عوامل موثر بر میانگین بین استافیلوکوکوس اورئوس و مواد غذایی و همچنین شناسایی انتروتوکسین‌ها و سویه‌های انتروتوکسیژنیک



5. Balaban, N., Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* **61**: 1-10.
6. Belickova, E., Tkacikova, L., Naas, H.T., Vargova, M., Ondrasovic, M., Ondrasovicova, O., Obstitenikova, D., Toth, L. (2001). Staphylococci plate counts in foods of milk origin. *Veterinary medicine* **46**: 24-7.
7. Bergdoll, M.S., Easton, C.S.F., Adlam, C. (1983). Staphylococci and Staphylococcal infections. *London Academic Press*: 559-98.
8. Bergdoll, M.S., Robbins, R.N., Weiss, K., Borja, C.R., Huang, Y., Chu, F.S. (1973). The staphylococcal enterotoxins: similarities. *Contributions to Microbiology and Immunology* **1**: 390-6.
9. Boerema, J.A., Clemens, R., Brightwell, G. (2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* **107**: 192-201.
10. Cenci-Goca, B.T., Karama, M., Rossitto, P.V., Morgante, R.A., Cullor, J.S. (2003). Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from mastitic cows. *Journal of Food Protection* **66**: 1693-6.
11. Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M. (2006). Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *Journal of Dairy Science* **89**: 163-9.
12. Silva, E.R., Carmo, L.S., Silva, N. (2005). Detection of the enterotoxins A, B and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology* **106**: 103-7.
13. Jorgensen, H.J., Mork, T., Rorvik, L.M. (2005). The occurrence of *staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* **88**: 3810-7.
14. Khan, M.A., Kim, C.H., Kakoma, I., Morin, E., Hansen, R.D., Hurley, W.L. (1998). Detection of *staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. *American Journal of Veterinary Research* **59**: 807-13.

نوظهور تا حدود زیادی ما را در زمینه پیشگیری از مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی یاری خواهد نمود. همچنین روش‌های جدید و حساس تری باید در زمینه تشخیص انتروتوکسین‌ها و سویه‌های توکسین‌زا در مواد غذایی مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. نتایج این مطالعه و مقایسه آنها با نتایج مطالعات انجام شده در ایران و سایر کشورها نشان دهنده خطر بالای مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در مصرف کنندگان محصولات لبنی شهر ماکو و توزیع جغرافیایی غیر همسان جدایه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در ایران و سایر کشورها می باشد.

#### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ماکو که هزینه این تحقیق را از محل طرح مصوب تامین نمودند سپاسگزاری می شود.

#### منابع

1. Adwan, G., Abusafieh, D., Aref, R. (2005). Prevalence of microorganism associated with intramammary infection in cows and small ruminants in the north of Palestine. *Journal of Slamic Univrity of Gaza* **13**: 165-73.
2. Aragon-Alegro, L.C., Konta, E.M., Suzuki, K., Silva, M.G., Júnior, A.F., Rall, R., Rall, V.L.M. (2007). Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. *Food Control* **18**: 630-4.
- 3.
4. Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa, H., Kozaki, S. (2003). An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection* **130**: 33-40.

- cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. *Veterinarski Arhiv* **83**: 23-30.
24. Rodriguez, E., Arques, J.L., Gaya, P., Tomillo, J., Nunez, M., Medina, M. (2000). Behavior of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin producing starter cultures. *Milchwissenschaft* **55**: 633-5.
  25. Rosec, J.P., Gigaud, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology* **77**: 61-70.
  26. Sharma, N.K., Rees, C.E., Dodd, C.E. (2000). Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 1347-53.
  27. Stephan, R., Annemuller, C., Hassan, A.A. (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology* **78**: 373-82.
  28. Stephan, R., Buehler, K., Lutz, C. (2002). Prevalence of genes encoding enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* isolates from bulk-tank milk samples in Switzerland. *Milchwissenschaft* **57**: 502-4.
  29. Stephan, R., Dura, U., Untermann, F. (1999). Resistance situation and enterotoxin production capacity of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis milk samples. *Schweiz Arch Tierheilkd* **141**: 287-90.
  30. Tsen, H.Y., Yu, G.K., Wang, K.C., Wang, S.J., Chang, M.Y., Lin, L.Y. (1998). Comparison of enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) strains and antibiotic susceptibility for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *Food Microbiology* **15**: 33-41.
  31. Vernozy, C., Meyrand, A., Mazuy, Ch., Delignette, M.L., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C., Richard, I. (1998). Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening raw goat's milk lactic cheeses. *Journal of Dairy Research* **65**: 273-81.
  15. Loncarevic, S., Jørgensen, H.J., Løvseth, A., Mathisen, T., Rørvik, L.M. (2005). Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 344-50.
  16. McLauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'Neill, G. (2000). The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection* **63**: 479-88.
  17. 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. *Veterinary Microbiology* **124**: 66-72.
  18. Sanchez, G., Rodriguez, R., Olvera, P.R., Mota, L. (2003). Development of two multiplex polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *Journal of Food Protection* **66**: 1055-62.
  19. Normanno, T.G., Salandra, A., Dambrosio, N.C., Quaglia, M., Corrente, A., Parisi, G., Santagada, A. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **115**: 290-6.
  20. Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y. (2002). Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 857-62.
  21. Orwin, P.M., Fitzgerald, J.R., Leung, D.Y., Gutierrez, J.A., Bohach, G.A., Schlievert, P.M. (2003). Characterization of *S. aureus* enterotoxin L. *Infection and Immunity* **71**: 2916-9.
  22. Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Guster, K. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Microbiology* **118**: 186-93.
  23. Rahimi, E., Alian, F. (2013). Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in

32. Zschock, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamman, H.P., Lammler, Ch. (2005). Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* positive *staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* **108**: 243-9.

## The prevalence of Enterotoxigenic Isolates of *Staphylococcus aureus* in Bovine and Sheep Bulk Tank Milk Samples of Maku

Sadeghi, M.R.<sup>1\*</sup>

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Agriculture and Food Science Engineering, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran

Received date: 6 January 2014

Acceptance date: 10 May 2014

---

**Abstract:** Food-borne diseases are one of the major concerns of food and drug administration (FDA) and world health organization (WHO). Up to the present day, more than 250 types of food-borne diseases have been described and bacteria are responsible for two-third of them. Bacterial food poisoning is one of the most common food-associated diseases that are usually related to the consumption of contaminated foods with toxigenic bacteria. Among the bacterial agents responsible for food poisoning, staphylococcus aureus is the most common food poisoning agent worldwide. Milk and dairy products are the most common foods associated to staphylococcal food poisonings. Therefore, this study was considered to investigate the prevalence of enterotoxigenic isolates of *Staphylococcus aureus* in bovine and sheep bulk tank milk samples of Maku city. In this study, a total of 178 milk samples including bovine (n=92) and sheep (n=86) milk samples were collected. A total of 76 isolates from milk samples was examined for the production of staphylococcal enterotoxins and associated genes using Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) and Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) respectively. Out of 44 and 32 isolates from bovine and sheep bulk tank milk samples 19 (43.1%) and 13 (40.6%) were enterotoxin producers respectively. SEA, SED and SEC were the most common toxins detected in all isolates. The prevalence of classical enterotoxins and related genes are shown by SET-RPLA and m-PCR corresponded in 91.1% of all *S.aureus* isolates, analyzed by both methods. Non-correspondence was observed in two sea positive isolates that were SEA negative, and in one isolates that were SEA and SEC positive only genes for sec were detected. This study indicated a high incidence of enterotoxigenic isolates of *staphylococcus aureus* in bovine and sheep bulk tank milk samples in Maku city.

---

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Enterotoxigenic, Bulk-tank milk, Maku

---

\*Corresponding author: Sadeghi, M.R.

Address: Department of Microbiology, Faculty of Agriculture and Food Science Engineering, Maku Branch, Islamic Azad University, Maku, Iran. Tel: 04623279900.

Email: phdmohammadreza@gmail.com