جداسازی و شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* از فرآورده‌های گوشتی و بررسی حضور ژن مولد انتروتوکسین A

مهسا سپیدارکیش*[۱]، مسعود قانع[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی، دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، تنکابن، ایران.
۲- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی، تنکابن، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: mahsa.sepidar@gmail.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۱ پذیرش نهایی: ۹۳/۶/۷)

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس، یکی از مهمترین عوامل ایجادکننده بیماری‌های منتقله از راه مواد غذایی می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در فرآورده‌های گوشتی و شناسایی ژن تولیدکننده انتروتوکسین SEA می‌باشد. پس از جمع‌آوری ۱۵۰ نمونه گوشتی، نمونه‌ها با استفاده از تکنیک استاندارد کشت و تست‌های فنوتایپینگ استاندارد از نظر وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی ژن ***sea*** صورت گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، در ۱۹ مورد نمونه (۱۲/۶٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا گردید. بیشترین میزان آلودگی به ترتیب، مربوط به ماهی دودی (۳۰٪)، کباب لقمه (۱۶/۶٪)، انواع کالباس و ژامبون (۱۳/۳٪) و شنسل مرغ (۳/۳٪) بود. در انواع سوسیس هیچ موردی از آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نگردید. بررسی‌های آماری نشان داد که در مقایسه میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* و نوع فرآورده‌های گوشتی اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد ($p< ۰/۰۵$). همچنین با انجام تکنیک PCR مشخص گردید که ژن ***sea*** در هیچیک از جدایه‌ها وجود ندارد. در این مطالعه میزان آلودگی مواد غذایی مورد بررسی به *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبتاً قابل ملاحظه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین SEA، تکنیک PCR، فرآورده‌های گوشتی

مقدمه

بیماری‌های منتقله از راه غذا معضل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند؛ به طوریکه سالانه با صرف هزینه‌های چند میلیارد دلاری، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان به آن مبتلا، بخشی نیز دچار مرگ شده و یا عامل بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌گردد .*استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان دومین علت مهم این بیماری‌ها محسوب می‌شود (Eshraghi *et al.*, 2009). مسمومیت غذایی این باکتری که به علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذاها می‌باشد، برخلاف مسیر آرام خود خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای ایجاد می‌نماید (Eshraghi *et al.*, 2009). تخمین زده می‌شود که تقریباً ۲۵٪ از کل گونه‌های جدا شده، انتروتوکسیژنیک هستند (Giannatale *et al.*, 2011). انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (SE ها) عوامل ایجادکننده مسمومیت غذایی هستند و شامل گروهی از پروتئین‌های کروی با زنجیره ساده به وزن مولکولی ۲۸۰۰۰ تا ۳۵۰۰۰ می‌باشند (Adibfar, 1383). آن‌ها اگزوتوکسین‌های معدی- روده‌ای قوی می‌باشند که در طول فاز لگاریتمی رشد یا در طول گذر به فاز سکون سنتز می‌گردند (Argudín *et al.*, 2010) .

انتروتوکسین‌ها ابر آنتی‌ژن‌هایی هستند، که به مولکول‌های MHC کلاس II پیوند یافته و سبب تحریک سلول‌های T می‌شوند (Jawetz *et al.*, 1387). از آنجا که این انتروتوکسین‌ها تحت شرایط دمایی، pH پایین و آنزیم‌های پروتئولیتیک مقاوم می‌باشند، طی فرایند هضم در معده فعال باقی می‌مانند (Argudín *et al.*, 2010). هفت کلاس اصلی آنتی‌ژنی از انواع انتروتوکسین‌ها شامل: SEA، SEB، SEC_1، SEC_2، SEC_3، SED و SEE تاکنون شناسایی شده است (Rahimi *et al.*, 2012). ژن‌های کدکننده SEها پشتبان‌های ژنتیکی متفاوتی از قبیل *sea* (پروفاژ)، *seb* (کروموزوم، پلاسمید، ترانسپوزون)، sec_1 (پلاسمید)، $sec_{2,3}$ (جزایر بیماری‌زایی)، *sed* (پلاسمید)، *see* (فاژ ناقص) داشته که غالبا عناصر ژنتیکی متحرک می‌باشند (Loir *et al.*, 2003). SEA رایج‌ترین توکسینی است، که در شیوع مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی وجود دارد. مقدار SEA لازم برای ایجاد مسمومیت متغیر می‌باشد، به‌طوری‌که مقدار لازم برای ایجاد عمل استفراغ ۲۰ تا ۰/۲ میکروگرم است (Pepe *et al.*, 2006). با شناخت میزان شیوع این باکتری در مواد غذایی می‌توان اولاً منبع عفونت را شناسایی نمود و سپس با کمک گرفتن از روش‌های استاندارد، آلودگی این قبیل مواد غذایی را به حداقل رساند. هدف از انجام این مطالعه، تعیین میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در فرآورده‌های گوشتی و شناسایی ژن تولیدکننده انتروتوکسین SEA می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌های آزمایشی: ۱۵۰ نمونه از فرآورده‌های گوشتی کارخانجات گوناگون شامل ۳۰ نمونه سوسیس، ۳۰ نمونه کالباس و ژامبون، ۳۰ نمونه کباب لقمه خام، ۳۰ نمونه شنسل مرغ نیمه پخته و ۳۰ نمونه از انواع ماهی دودی جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی انتقال یافت. نمونه‌ها در زیر هود با استفاده از اسکالپل استریل قطعه قطعه شده و به منظور غربالگری به محیط کشت نوترینت براث (مرک-آلمان) حاوی ۷/۵ درصد نمک انتقال یافتند. گرمخانه‌گذاری به

مدت ٤٨ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط برد پارکر آگار (مرک- آلمان) با زرده تخم‌مرغ و تلوریت پتاسیم کشت شدند. کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که به رنگ سیاه بر روی محیط رشد کرده بودند برای تأیید نهایی مورد آزمایشات رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست کواگولاز، تست DNase و تخمیر مانیتول قرار گرفتند.

استخراج DNA: استخراج DNA تمامی سویه‌های جدا شده به کمک لیزوزیم و کیت استخراج (کیاژن) انجام شد. تأیید استخراج DNA با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۸۰-۲٦۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر صورت پذیرفت.

واکنش PCR برای شناسایی ژن *sea*: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت یافتن ژن *sea* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (تک کپنهاگن-دانمارک) صورت گرفت. (جدول۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل مستر میکس PCR (کیاژن) ۱۰ میکرولیتر، پرایمر فوروارد ۱ میکرولیتر، پرایمر ریورس ۱ میکرولیتر، آب مقطر استریل ۳ میکرولیتر و DNA نمونه ۵ میکرولیتر انجام گرفت. جهت آغاز فرایند پلیمریزاسیون، دستگاه ترمال سیکل به مدت ۵ دقیقه بر روی دمای ۹۵ درجه سلسیوس جهت دناتوراسیون اولیه تنظیم گردید. متعاقب آن ٤٠ سیکل PCR به صورت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۵۱ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه اجرا گردید. در نهایت به مدت ۵ دقیقه عمل طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس اجرا گردید (جدول۲).

جدول ۱- توالی پرایمرها در ژن انتروتوکسین

ژن	پرایمر	سکانس اولیگونوکلئوتیدی (5'-3')	سایز (bp)	رفرنس
Sea	*sea*-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	۱۲۰	Giannatale *et al*., 2011
	sea-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA		

جدول ۲- شرایط PCR برای تکثیر ژن *sea*

۱ سیکل	تقلیب اولیه	۹۵ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه
٤٠ سیکل	تقلیب	۹۵ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه
	اتصال پرایمرها	۵۱ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه
	طویل‌سازی	۷۲ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه
۱ سیکل	طویل‌سازی نهایی	۷۲ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه

آنالیز آماری

از آزمون کای دو برای بررسی مقایسه بین میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* و نوع فرآورده‌های گوشتی، استفاده گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه ۱۵۰ نوع فرآورده گوشتی از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع در ۱۹ مورد (۱۲/٦٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا گردید. بیشترین میزان آلودگی به ترتیب در ماهی دودی با ۹ مورد (۳۰٪)، کباب لقمه با ۵ مورد (۱٦/٦٪)، انواع کالباس و ژامبون با ٤ مورد (۱۳/۳٪) و شنسل مرغ با ۱ مورد (۳/۳٪) بود. لازم به ذکر است که درصد فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوسیس برابر با صفر بوده است.

مقدار p–برای آزمون استقلال کای‌دو ۰/۰۰٤ و کوچکتر از ۰/۰۵ بود که نشانه تایید وجود رابطه میان میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* و نوع فرآورده‌های گوشتی در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد.

نتایج PCR برای ژن *sea* نشان داد پس از انتقال محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ و انجام الکتروفورز، در هیچ یک از نمونه ها ژن *sea* شناسایی نگردید.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه که بر روی فرآورده‌های گوشتی مختلف صورت پذیرفت، ۱۵۰ ماده ی غذایی مورد بررسی قرار گرفت و در ۱۹ مورد (۱۲/٦٪) *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا گردید. بیشترین میزان آلودگی به ترتیب مربوط به ماهی دودی با ۹ موردآلودگی، کباب لقمه با ۵ مورد، انواع کالباس و ژامبون با ٤ مورد، شنسل مرغ با ۱ مورد آلودگی بود و در انواع سوسیس هیچ موردی از آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نگردید. مطالعه حاضر اولین مطالعه انجام شده بر روی شنسل مرغ می‌باشد که شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* را در این محصول ۳/۳٪ نشان می‌دهد. همچنین مطالعات اندکی بر روی فرآورده‌های گوشتی ای نظیر سوسیس و کالباس صورت پذیرفته است. به نظر می‌رسد بالا بودن میزان آلودگی در ماهی دودی به دلیل تهیه ی غیر بهداشتی آن توسط افراد محلی باشد. و علت این که در سوسیس‌ها هیچ موردی از آلودگی دیده نشد، این است که این فرآورده در شرایط بهداشتی و در بسته‌بندی‌های مناسب در کارخانجات تهیه می‌گردد. و بسته‌بندی مناسب آن باعث می‌شود که کمتر در معرض آلودگی قرار گیرد. در مطالعه‌ای که بر روی شناسایی و میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از حیوانات و سبزیجات در کره‌جنوبی صورت گرفته، *استافیلوکوکوس اورئوس* با شیوع ۳٦٪ از فرآورده‌های گوشتی جدا گردیده است (Moon et al., 2007).

در مطالعه‌ای که توسط جیاناتال Giannatale و همکاران (۲۰۱۱) بر روی جداسازی و شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* از غذاهای مصرفی انسان در ایتالیا صورت گرفته؛ آن‌ها توانستند *استافیلوکوکوس اورئوس* را با شیوع ۱۹/۳٪ از فرآورده‌های گوشتی جداسازی نمایند، که این مطالعات با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارند. میزان آلودگی در کشورهای گوناگون متفاوت است که باعث ایجاد شیوع‌های متفاوتی می‌گردد. همچنین در این مطالعه با انجام تکنیک PCR

مشخص گردید که ژن *sea* در هیچ یک از جدایه‌ها وجود ندارد. در مطالعه‌ای که بر روی بررسی میزان فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* و انتروتوکسین A استافیلوکوکی در جوجه‌های سوخاری در ایتالیا انجام گرفته؛ آن‌ها از مجموع ۲۰ جوجه سوخاری صنعتی نتوانستند هیچ ژن *sea* ای را شناسایی کنند (Pepe *et al.*, 2006).

در مطالعه‌ای که بر روی میزان شیوع ژن انتروتوکسین‌های معمول در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز به روش Multiplex PCR انجام گرفته، نتایج حاصل نشان داده که از ۷۵ نمونه باکتریایی یک جدایه واجد انتروتوکسین‌های SEB و SEC، سه جدایه واجد انتروتوکسین SEC بودند و ژن مربوط به انتروتوکسین A در هیچ کدام از جدایه‌ها شناسایی نگردیده است (Esnaashari et al., 2012) که این مطالعات با تحقیق صورت گرفته همسو می‌باشند.

در یک مطالعه در ایتالیا که توسط فیرینو و همکاران در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت، ثابت شد که ٤٥/٢٪ از گونه‌های جدا شده از محصولات گوشتی انتروتوکسین تولید می‌کنند. که فراوانی آن‌ها به ترتیب شامل انتروتوکسین C٥١/٥٪، انتروتوکسین A ٣٠/٣٪ و با گستردگی کمتر SEB و SED قرار داشتند (Giannatale *et al.*, 2011).

در یک مطالعه که به وسیله نورمنو و همکاران (2005) ٢٣/١٪ از محصولات گوشتی تازه و آماده بازار در ایتالیا به وسیله *استافیلوکوکوس اورئوس*های انتروتوکسیژنیک آلوده بودند. که قسمت عمده *استافیلوکوکوس اورئوس*های انتروتوکسیژنیک جدا شده SEA و SEC تولید می‌کرده‌اند. در تحقیقی دیگر که توسط پلیسر و همکاران (۲۰۰۹) بر روی شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و شناسایی ژن‌های انتروتوکسین در محصولات گوشتی صورت گرفته؛ آن‌ها توانستند ثابت کنند که از مجموع ۱۰۲ نمونه گوشت آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۹۱ مورد ژن *femA*، ۱۰ مورد ژن *sea*، ۱۲ مورد ژن *sed* و ٤ مورد ژن *see* را دارا می‌باشند. در تحقیقی که بر روی پروفایل‌های ژن انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* و دیگر استافیلوکوک‌ها جدا شده از غذاهای گوناگون صورت گرفت؛ از مجموع ۷۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده در ۲ نمونه گوشت مرغ (٢/٩٪) ژن *sea* شناسایی شد (Gencay *et al.*, 2010). که این مطالعات با تحقیق حاضر همسو نمی‌باشند. بدین جهت عفونت‌های منتقله از راه غذا و مسمومیت‌های غذایی، نگرانی بسیار مهمی برای دولت‌ها و صاحبان صنایع غذایی در چند دهه اخیر بوده است. در هر حال میزان آلودگی مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در کشور ما نسبتاً قابل ملاحظه می‌باشد (Eshraghi *et al.*, 2009). از طرفی افراد در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و موارد نقص ایمنی در ایران جمعیت نسبتاً زیادی را به خود اختصاص می‌دهند. این موضوع با در نظر گرفتن میزان بالای کلونیزاسیون این باکتری در افراد سالم که گاه تا ٦٠-٥٠٪ در ناحیه نازوفارنکس و ٣٠-٥٪ در پوست و مو می‌رسد، به خصوص از ناحیه مسئولین تهیه غذاها پر رنگتر می‌شود (Eshraghi *et al.*, 2009). همچنین آگاهی جامعه از میزان شیوع باکتری و انتروتوکسین‌های تولید شده توسط آن از ابتلا افراد به بیمارهای گوارشی می‌کاهد.

منابع

- ادیب فر، پرویز (۱۳۸۳). میکروب‌شناسی پزشکی. انتشارات نور دانش، صفحات ۷۴-۶۳.
- اشراقی، سعید؛ صالحی پور، زهره؛ پورمند، محمدرضا؛ رحیمی دروشانی، عباس؛ زهرا صالحی، محمدتقی؛ آقامیری، سولماز؛ همکاران (۱۳۸۸). بررسی توزیع فراوانی ژن tst با ژن های entC, ent A, ent A/C در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از مواد غذایی مختلف. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۷، شماره ۷، صفحات ۴۷۶-۴۷۰.
- اثنی عشری، مهرداد؛ شایق، جلال و عمران نصرالهی، آیت الله (۱۳۹۱). مطالعه میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسین‌های معمول *استافیلوکوکوس اورئوس* های جدا شده از شیر گاومیش‌های استان تبریز به روش Multiplex PCR. مجله بهداشت مواد غذایی تبریز، دوره ۲، شماره ۲، صفحات ۶۸-۶۱.
- جاوتز، ارنست؛ ملنیک، جوزف لویس؛ آدلبرگ، ادوارد؛ بروکس، ژئو؛ بوتل، ژانت و استفان، مورس (۱۳۸۷). میکروب‌شناسی پزشکی. ترجمه: رحیمی، محمد کریم و اطهری، عمید، انتشارات آییژ، تهران، ایران، صفحه ۲۶۹.

- Argudín, M.A., Mendoza, M.C. and Rodicio, M.R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Entrotoxins. Toxins, 2(7): 1751-1773.
- Gencay, Y.E., Ayaz, N.D. and Dogru, A.K. (2010). Enterotoxin Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* and Other Staphylococcal Isolates from Various Foods and Food Ingredients. Journal of Faculty of Veterinary Medicine Erciyes University, 7(2): 75-80.
- Giannatale, E.D., Prencipe, V., Tonelli, A. and Marfoglia, C. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* trains isolated from food human consumption. Veterinaria Italiana, 47(2): 165-173.
- Loir, Y.L., Baron, F. and Guatier, M. (2003). *Staphyloococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research, 2(1): 63-76.
- Moon, J.S., Lee, A.R., Jaw, S.H., Kang, H.M., Joo, Y.S., Park, Y.H., *et al*. (2007). Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. Journal of Food Protection, 70(11): 2541-8.
- Oh, S.K., Lee, N., Cho, Y.S., Shin, D.B., Choi, S.Y. and Koo, M. (2007). Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. Journal of Food Protection,70(5): 1153-8.
- Pelisser, M.R., Klein, C.S., Ascoli, K.R., Zotti, T.R. and Arisi, A.C.M. (2009). Ocurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. Brazilian Journal of Microbiology, 40(1): 145-148.
- Pepe, O., Blaiotta, G., Bucci, F., Anastasio, M., Aponte, M. and Villani, F. (2006). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process. Applied and Environmental Microbiology, 72(11): 7057–7062.
- Rahimi, E., Mommtaz, H., Shakerian, A. and Kavyani, H.R. (2012). The detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in raw cow milk using the ELISA method. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 36(3): 319-322.

Isolation, identification and the presence of enterotoxin A gene in *Staphylococcus aureus* from meat products

Sepidarkish, M.[1*], Ghane, M.[2]

1- Ms.c Graduate of Microbiology, Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
[*]Corresponding author email: mahsa.sepidar@gmail.com
(Received: 2014/2/20 Accepted: 2014/8/29)

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the main causes of food-born illnesses. The aim of this study was to determine the prevalence of *S. aureus* in meat products and to detect the presence of *S. aureus* enterotoxin A (SEA) gene. Totally 150 meat products were collected and analyzed using standard culture techniques to detect *S. aureus*. PCR assay by specific primers was performed on the isolates to identify SEA gene. According to the results, 19 (12.6%) of the samples were found positive for *S. aureus*. Highest prevalence rate was determined in smoked fish (30%), followed by fried morsels (16.6%), Salami and Ham (13.3%), and Shensel chicken (3.3%). *S. aureus* was not observed in any of Sausage samples. Statistical analysis showed that there is statistically significance association between the prevalence of *S. aureus* and meat products. Moreover, results did not show SEA gene in any of the isolates. This study concluded a remarkable occurrence of *S. aureus* in meat products.

Key words: *Staphylococcus aureus*, SEA enterotoxin, PCR technique, Meat Products