# جداسازی و شناسایی مولکولی ژن های تولید انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارئوس از شیر خام گاو

حمیده جلالیانی[۱]، سید امیرعلی انوار[۱*]، کیومرث امینی[۲]، گیتی کریم[۳]

## چکیده

این پژوهش بر آن بوده است تا با شناسایی مولکولی و جداسازی ژن های تولید انتروتوکسین های استافیلوکوکوس ارئوس از شیر خام گاو به بررسی شیوع تولید عوامل بیماری زا بپردازد. در این تحقیق، ۱۰۰ نمونه ۲۰۰ میلی‌لیتری شیر خام از مراکز تولید محصولات لبنی و دامداری‌های استان تهران تهیه شد. شناسایی و جداسازی استافیلوکوکوس‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی، رنگ آمیزی گرم انجام شد. نمونه‌های حاوی این سویه‌ها از نظر تولید سوپرآنتی ژن‌ها توسط Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند و وجود انتروتوکسین های اختصاصی SEA-SEE تعیین شد. نتایج به دست آمده از آزمون‌ها نشانگر این بود که ٦٠ سویه استافیلوکوکوس از ۱۰۰ نمونه جداسازی شد که در ژنوم ٥٤ سویه ژن‌های هدف حضور داشتند و در ۳ نمونه میزان سوپرآنتی ژن‌ها در بیشترین فراوانی خود بود. تعداد ۱۰ باکتری دارای سوپر آنتی ژن SEA، ٥ باکتری دارای سوپر آنتی ژن SED،٤ باکتری دارای سوپر آنتی ژن SEE ، یک باکتری فقط دارای سوپر آنتی ژن SEB، ۷ باکتری دارای سوپرآنتی ژن SEC، ۲ باکتری دارای دو سوپر آنتی ژن SEC و SEA و یک باکتری هم دارای دو سوپر آنتی ژن SEE و SEA بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد شیوع انتروتوکسین های استافیلوکوکی در شیر خام گاو به ویژه با مشکل رو به رشد مقاومت ضد میکروبی، یک معضل بسیار مهم به شمار میرود. استفاده از مطالعات اپیدمیولوژیک بر پایه بررسی های دقیق مولکولی مانند Multiplex PCR نتایج امیدوارکننده ای را در جلوگیری از شیوع باکتری های بیماری زا و عفونی نشان داده است.

***واژگان کلیدی: شیر، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین***

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۸/۱٥ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۱۰/۲۳

### مقدمه

امروزه اثبات گردیده است که شیر یکی از مهم‌ترین مواد غذایی است. شیر و فرآورده‌های آن جزء اساسی‌ترین مواد غذایی هستند که بین مواد غذایی مختلف، نزدیک‌ترین حالت را به یک غذای کامل دارند. لبنیات و مواد غذایی مشتق از شیر همچنین سرشار از انواع مواد مغذی، از قبیل پروتئین مرغوب و کلسیم هستند و مقاومت بدن در مقابل بسیاری از بیماری‌های عفونی و بیماری‌های ناشی از سوءتغذیه را افزایش می‌دهند (۱–۳). ازاین‌رو، مصرف آن اهمیت بسیاری دارد و فقدان آن باعث بروز مشکلات فراوانی از جمله سوء تغذیه و پوکی استخوان می‌گردد. امروزه اهمیت شیر و محصولات لبنی در تأمین احتیاجات انسان از قبیل انرژی، پروتئین، ویتامین (به ویژه ویتامین ب) و مواد معدنی ضروری (به ویژه کلسیم) به‌خوبی مشخص شده است. همچنین با توجه به اهمیت شیر در تغذیه انسان و سلامت جامعه، آگاهی از ترکیبات و سلامت آن، امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است. ترکیبات اصلی شیر شامل آب (۸۷ درصد)، چربی (۳/۷ درصد)، مواد جامد بدون چربی از جمله پروتئین (حدود۳/۲ درصد)، لاکتوز (٤/۹ درصد)، مواد معدنی (۰/۸ درصد)، ویتامین‌ها و دیگر ترکیبات (۰/٥ درصد) می‌باشد (٤–٦).

در زمان دوشیدن، شیر دارای تعداد بسیار کمی باکتری است یا به‌عبارت‌دیگر بار میکروبی کمتر از ۱۰۰۰ باکتری در میلی لیتر دارد. البته این مقدار در دام‌های مختلف تا حد زیادی متغیر است و در مواردی حتی تا ۱٥۰۰۰ میکروارگانیزم در میلی لیتر نیز می‌رسد. شیر به دلیل رطوبت زیاد،pH نزدیک به خنثی و غنی بودن مواد غذایی،

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. Saaa4824@gmail.com
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران.
۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

محیط مناسبی برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌هاست؛ بنابراین بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادر به رشد در چنین محیطی میباشند (۷-۹). مهمترین میکروارگانیسم‌های بیماریزای شیر شامل مایکوباکتریوم، بروسلا، کامپیلوباکترججونی، سالمونلا، لیستریا، توکسوپلاسما و اشرشیاکلی می‌باشند. سایر میکروارگانیسم‌های بیماریزای شیر شامل استافیلوکوکوس اورئوس ، ویبریو کلرا، کوکسیلا برنتی، کلستریدیوم پرفرنژنس و غیره به شمار میروند که از میان آنها استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های عامل بروز ورم پستان در دنیا محسوب می‌شود و می‌تواند در شیر سموم مقاوم به حرارت تولید نماید (۱۰, ۱۱).

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبت و بی هوازی اختیاری است که مهم‌ترین گونه در جنس استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. این باکتری دارای عوامل بیماری زای بسیاری است و توکسین ها از مهمترین آنها به شمار میرود. انتروتوکسین های استافیلوکوکی پروتئین‌های تک زنجیری با وزن مولکولی پایین هستند که از نظر ترکیب و فعالیت بیولوژیکی مشابه هم بوده و از نظر آنتی ژنی متفاوتند. چندین انترونوکسین استافیلوکوکی متفاوت از نظر سرولوژیکی شناسایی شده که متشکل از انتروتوکسین های کلاسیک (A تا Eو) انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی جدیداً توصیف شده شامل SEG تا SER و SEU هستند. چون انتروتوکسین های استافیلوکوکی ترکیبات مقاوم به حرارت می‌باشند، در جریان فرآوری شیر از بین نمی‌روند. در مواقع استفاده از شیر خام آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس، خطر آلودگی فرآورده‌های لبنی به انتروتوکسین ها بالا می‌باشد (۱۲-۱٤).

باید توجه داشت که جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مولد انتروتوکسین به ویژه انواع مولد انتروتوکسین A به عنوان یکی از عوامل اصلی مسمومیت می‌باشد. نتایج حاصل از تحقیقات مختلف شیوع بالای استافیلوکوکوس اورئوس‌های مولد انتروتوکسین در سایر کشورها را در شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان و فرآورده‌های شیری تأیید می‌نمایند. در ارتباط با موارد مسمومیت ناشی از فرآورده‌های غذایی باید توجه داشت که بخشی از این موارد با مصرف شیر و فرآورده‌های لبنی ایجاد می‌گردد (۱۲, ۱٤, ۱۵). از این رو این مطالعه بر آن بوده است تا با شناسایی مولکولی و جداسازی ژنومی ژن های تولید انتروتوکسین های استافیلوکوکوس اورئوس از شیر خام گاو قدمی را در جهت مطالعه هر چه بیشتر شیوع این سویه ها در مراکز اصلی تولید شیر در استان تهران بردارد.

**مواد و روش‌کار**

نمونه برداری

به منظور انجام این مطالعه، ۱۰۰ نمونه ۱۰۰ میلی‌لیتری شیر خام در لوله‌های درب دار استریل و در شرایط استریل تهیه گردید و در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌ها بدین شکل جمع آوری شدند که ۵ نمونه از مراکز جمع آوری شیر شرکت‌های صنعتی (پگاه، کاله، پاک، دامداران و میهن) استان تهران تهیه شد. برای ۱۱۵ نمونه دیگر، به صورت تصادفی ۵ گروه ۲۳ تایی از گاوداری‌های استان تهران انتخاب شدند. هر گروه ۲۳ تایی تحت پوشش یکی از مراکز جمع آوری شرکت‌های صنعتی بودند و از تانکرهای ذخیره شیر آنها مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۲٦ نمونه برداری صورت می‌گرفت.

جداسازی سویه های استافیلوکوکوس اورئوس

برای رشد استافیلوکوکوس ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌های اخذ شده بعد از یکنواخت کردن به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت Cooked meat براث (Merck، آلمان) انتقال می‌یافت و به مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری کرده سپس بر روی محیط کشت جامدparker agar Baird (Merck، آلمان) با استفاده از

روش کشت سطحی کشت داده و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شدند. هر کدام از پرگنه‌های سیاه دارای هاله روشن در مرحله بعد بر روی محیط کشت افتراقی agar Mannitol salt (Merck،آلمان) به منظور بررسی تخمیر مانیتول و انجام تست‌های بیوشیمیایی از جمله کاتالاز و کواگولاز مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌های مانیتول، کاتالاز و کواگولاز مثبت به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس فرض گردیده و تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در محیط Tryptic soy broth Merck)، آلمان) حاوی ۱۵درصد گلیسرول در دمای ۲۰ – درجه سلسیوس نگه‌داری می‌شدند (استاندارد ملی ایران به شماره ۱–٦٨٠٦،١٣٨٤) (١٦).

ذخیره سازی جدایه‌های بدست آمده

برای این کار کلنی باکتری در محیط ۵ میلی‌لیتری BHI Broth کشت داده شد و پس از رشد، در تیوب ۱/۵ از آن رسوب سلولی تهیه شد. به این صورت که در شرایط استریل ابتدا ١/٦ میلی‌لیتر از محیط به تیوب اضافه شده و در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کرده و پس از خالی کردن محلول رویی مجدداً ١/٦ میلی‌لیتر از محیط کشت به تیوب اضافه گردید و سانتریفیوژ شد. در مرحله‌ی بعد باقیمانده‌ی محیط هم در تیوب ریخته و سانتریفیوژ شد. پس از تهیه‌ی رسوب سلولی، روی رسوب بدست آمده در شرایط استریل با سرنگ محیط BHI Broth دارای ۱۸٪ گلیسرول اضافه گردید و سپس به خوبی با محیط مخلوط شد. بعد از پایان کار، درب تیوب‌ها را با پارافیلم محکم شده و به مدت روز در فریزر ۲۰– قرار داده شد. بعد از این مدت تیوب‌ها به فریزر ۷۰– منتقل شد (١٦).

بررسی مولکولی

در این مطالعه به منظور بررسی مولکولی، استخراج DNA از کلنی ها با استفاده از کیت اختصاصی شرکت سیناژن (ایران) انجام گرفت. در مرحله بعد از شناسایی بیوشیمیایی گونه های باکتری موجود در شیر، برای تعیین سویه های واجد ژنهای انتروتوکسینی استافیلوکوکوس اورئوس، از تکنیک مالتیپلکس PCR استفاده گردید. در این پژوهش از چهار جفت پرایمر برای ژن‌های sec, seb, sea see, وsec استفاده شد و واکنشها در ۳۵ سیکل انجام گردید. پرایمرهای ژن های مذکور برای شناسایی مولکولی استافیلوکوکوس اورئوس، به عنوان ژن های تشخیص دهنده سویهها، انتخاب شد. پرایمرهای مربوط به ژن‌های هدف با استفاده از نرم‌افزار oligo10 طراحی شد. همه پرایمرها توسط شرکت پیشگام سفارش داده شدند (جدول ۱). میزان مواد PCR برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon, USA)، ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمر ها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ٤ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ٤ میکرولیتر آب مقطر بود. علاوه بر این شرایط دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ٥٦ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR در حضور کنترل منفی در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند و پس از رنگ آمیزی با اریتروژل توسط دستگاه ژل داک ( MahamAzma, Iran)از آنها عکسبرداری گردید (۱۷).

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه بـه منظـور جداسـازی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس واجد ژن انتروتوکسین

| Primer | 3´)-Sequence (5´ | Amplicon size (bp) |
|---|---|---|
| SEA | F: AAC CGA TGT ATT AGG TTC<br>R: ATT AAC CGA AGG TTC TGT | 102 |
| SEB | F: ACT GAC AAA CG TCG CAT CAA<br>R: GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC | 164 |
| SEC | F: TTT TTG GCA CAT GAT TTA ATT T<br>R: TAT TGT CGT TG CAA CCG TTT | 451 |
| SED | F: AGG ATT AAC CGA TTC TGT<br>R: ATC ACC CTA A TTC GGG AAA | 278 |
| SEE | F:TCG CAA ACT GAC CAT AAA CG<br>R: GCA GTG CC GGT ACT CTA TAA | 209 |

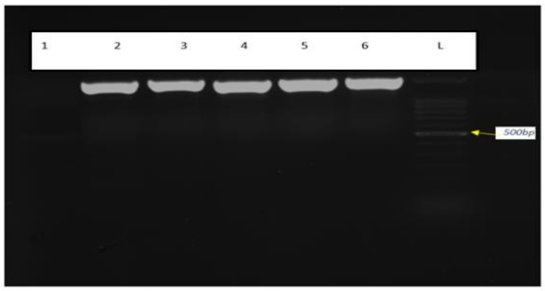
## نتایج

### نتایج جداسازی باکتری‌ها

از ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، پس از کشت و بررسی های بیوشـیمیایی، رنـگ آمیـزی گـرم و تشـخیص افتراقـی استافیلوکوکوس‌ها نشـان داد کـه در ۳۲ نمونـه هـیچ گونـه باکتری جداسازی نشد امـا در ٦٨ نمونـه شـیر جمـع آوری شده باکتری مشاهده شده است. باکتری های مشاهده شـده شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (٦٠ نمونه)، *اشرشـیا کـلای* (۵ نمونه)، و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۳ نمونه) بودند. از آنجـا کـه ایـن مطالعـه بـر روی شناسـایی مولکـولی و جداسـازی ژنـومی آنتـی ژن هـای انتروتوکسـینی *استافیلوکوکوس اورئوس* از شـیر خـام گـاو متمرکـز بـوده است، ۸ نمونه که از آنها سایر سویه ها جداسازی شده بـود و فاقد سویه های اسـتافیلوکوکوس بودنـد از مطالعـه کنـار گذاشته شدند.

### بررسی کیفیت DNA استخراج شده

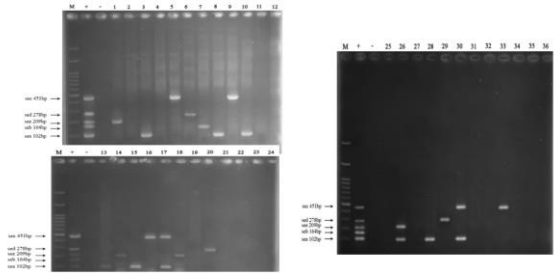
برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، مقداری از نمونـه DNA بر روی ژل آگـاروز ۱ درصـد در حضـور لـدر ۱۰۰ جفت بازی در ژل آگاروز ۱.۵ درصـدی الکتروفـورز شـد. بعد از الکتروفورز، در تمام نمونه ها تک باند بـدون اسـمیر مشاهده شد و در هیچ کدام از آنها، آلـودگی RNA (وجـود نوار اضافی در زیر نوار اصلی) مشاهده نشد. نتـایج بدسـت آمده نشان دهنده کیفیت بسیار خوب DNA استخراج شـده بود.



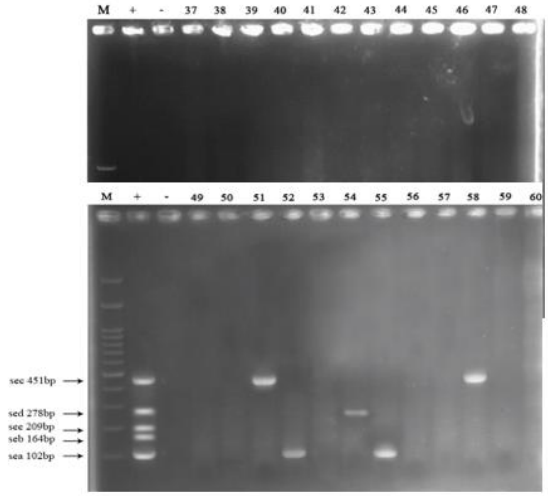

شکل ۱: الکتروفورز نمونـه‌های DNA بـر روی ژل آگـاروز ۲٪ سـتون شماره یک کنترل منفی و شماره ۲ تا ٦ متعلق به نمونه ژنوم جداسـازی شده از سویه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* و سـتون L نشـانگر لـدر ۱۰۰ جفت بازی است.

### نتایج Multiplex PCR برای تشخیص افتراقی باکتری ها

بررسـی وجـود انتروتوکسـین هـای SEC ، SED ، SEE ، SEB و SEA اختصاصی در باکتری هـای *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه هـای شـیر نشـان داد کـه تعـداد ۱۰ بـاکتری دارای سـوپر آنتـی ژن SEA، ۵ بـاکتری دارای سوپر آنتی ژن SED ،٤٠ باکتری دارای سوپر آنتـی ژن SEE ، یـک بـاکتری فقـط دارای سـوپر آنتـی ژن SEB، ۷ بـاکتری دارای سـوپرآنتی ژن SEC ، ۲ بـاکتری دارای دو سوپر آنتی ژن SEC و SEA و یـک بـاکتری هـم دارای دو سوپر آنتی ژن SEE و SEA بود. تصاویر ذیل نشـان دهنـده الکتروفورز محصولات PCR این ژن ها است.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR نمونه های ۱ تا ۳٦، ستون اول نشانگر لدر ۱۰۰ جفت بازی، ستون دوم کنترل مثبت و ستون سوم کنترل منفی را نشان می دهند.




شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR نمونه های ۳۷ تا ٦۰، ستون اول نشانگر لدر ۱۰۰ جفت بازی، ستون دوم کنترل مثبت و ستون سوم کنترل منفی را نشان می دهند.

**بحث**

این مطالعه بر آن بوده است تا با بررسی ژن های دخیل در تولید انتروتوکسین در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس*، به بررسی فراوانی آنها در شیر خام تولید شده در استان تهران بپردازد. بررسی مولکولی از طریق PCR نشان داد که از در ٦۰ سویه جداسازی شده *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد ۱۰ باکتری (١٦.٦٦ درصد) دارای سوپر آنتی ژن SEA، ۵ باکتری (۸.۳۳ درصد) دارای سوپر آنتی ژن SED ،٤ باکتری (٦.٦٦ درصد) دارای سوپر آنتی ژن SEE ، فقط یک باکتری (١.٦٦ درصد) دارای سوپر آنتی ژن SEB، ۷ باکتری (١١.٦٦ درصد) دارای سوپرآنتی ژن SEC ، ۲ باکتری دارای دو سوپر آنتی ژن SEC و SEA و یک باکتری هم دارای دو سوپر آنتی ژن SEE و SEA بود. مطالعات دیگر نیز هم سو با یافته های تحقیق حاضر نشان دادند که شیوع ژن های SE در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت است اما شیوع بالای ژن های SE در مطالعه ما و سایرین (۱۸)(20) (19) نشان دهنده خطر بالقوه برای ایجاد مسمومیت غذایی با منشا حیوانی است. از سوی دیگر شیوع فزاینده MRSA اکتسابی از جامعه و مقاومت آنتی بیوتیکی در حال ظهور آن در غذاها یک مشکل جدی برای سلامت عمومی است.

در همین زمینه در سال ۲۰۱۹ Isaac Omwenga و همکارانش در طی تحقیقی بر روی نمونه های شیر در کشور کنیا اعلام نمودند که حداقل یک نوع از ژن انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* (SE) در ۷٤.۱۱٪ با ۹۵٪ فاصله اطمینان از ۸۵ ایزوله شناسایی شد. آنها گزارش نمودند که ژن SEE؛ ٦۰٪، و سپس SEA ؛ ۲۵.۸۸٪، و SECدر ۲۲.۳۵٪ سویه ها مشاهده شد اما هیچ یک از جدایه ها برای SED مثبت نشد. به طور کلی، ۲۱ مورد از ۸۵ سویه دارای بیش از یک ژن انتروتوکسین بودند. بیش از نیمی از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حداقل یکی از ژن‌های کدکننده انتروتوکسین را در خود جای داده‌اند، که نشان میداد نمونه‌های شیر آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌توانند شانس بالایی برای ایجاد مسمومیت غذایی با استافیلوکوک داشته باشند (21). در سال ۲۰۱۷ Rodriguez و همکاران به بررسی نقش بالقوه ورود غیرقانونی مواد غذایی به اروپا در گسترش *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) بود. آنها شیوع و ویژگی های *استافیلوکوکوس اورئوس* و MRSA جدا شده از غذاهای با منشاء حیوانی را که از مسافران در پروازهای ٤۵ کشور غیر اتحادیه اروپا از سال ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۵ توسط مقامات مرزی در فرودگاه بین المللی بیلبائو (اسپانیا) و فرودگاه بین المللی وین (اتریش) مصادره شده بود، را مطالعه نمودند. پروفایل انتروتوکسین نشان داد که ۱۹ سویه MRSA انتروتوکسیژنیک بودند و دارای یک یا چند ژن SE بودند. ژن SEA در ۱۲ سویه مشاهده شد اما ژن SEE در هیچ یک از سویه ها گزارش نگردید. ایزوله‌های MRSA مثبت برای ژن‌های luk-PVL انتروتوکسیژنیک نبودند و هیچ یک از جدایه‌ها برای انتروتوکسین E مثبت نبودند. این یافته هم تنوع گسترده مقاومت ضد میکروبی موجود در

سویه ها و هم ظرفیت مقاومت نه تنها در برابر داروهای بتالاکتام را نشان می داد (22) . در تحقیق دیگری در ایران ولی زاده و همکاران در سال ۲۰۱٦ به شناسایی ژن های انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده Multiplex PCR پرداختند. در آن پژوهش تولید انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از عفونتهای چرکی ترشح دار, پوستی و دارای علائم اسهال و استفراغ در انسان مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج ژنومی سویه های ایزوله شده واکنش PCR چندگانه ای برای ژن های انتروتوکسین به کمک پرایمرهای اختصاصی انجام گردید و داده های آنها نشان داد که در مجموع, ۵۰٪ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده حاوی یک یا چند ژن انتروتوکسین بودند. فراوانترین ژن (۳۰٪) SEA بود و به دنبال آن به ترتیب(۱۰٪) (1.6%), SEE (8.3%), SED SEC , شناسایی شدند(23) .

مشعوف و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ به ارزیابی شیوع سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های غذایی با منشاء حیوانی، بررسی الگوی حساسیت ضد باکتریایی آنها و شناسایی ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوک (SEs) و ژن mecAدر *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده پرداختند. در مجموع ۱۰۵۰ نمونه غذا شامل ٦۷۱ شیر خام و فرآورده های لبنی و ۳۷۹ گوشت خام بین شهریور ۱۳۹۲ تا خرداد ۱۳۹۳ در همدان جمع آوری شد. نمونه های غذا برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی تمامی جدایه ها با استفاده از روش انتشار دیسک آگار و سپس شناسایی ژن مقاومت mecA با استفاده از PCR تعیین شد. علاوه بر این، ذخیره ژن‌های SE با استفاده از روش Multiplex PCR با هدف قرار دادن نه ژن مشخص شد. در تحقیق آنها در مجموع ۹۸ (۹.۳٪) سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۱۰۵۰ نمونه غذا جدا شد. از ۹۸ ایزوله مورد بررسی، بیشترین مقاومت به اریترومایسین (۳۰/٦ درصد) و پس از آن تتراسایکلین (۲۹/٦ درصد)، جنتامایسین (۲۷/٦ درصد)، کلیندامایسین (۲٦/۵ درصد)، سیپروفلوکساسین و ریفامپین (۲٤/۵ درصد)، تری متوپریم- سولفامتوکسازول مشاهده شد. (۱٤.۳٪) و سفوکسیتین (۵.۱٪). تمام ایزوله های مقاوم به سفوکسیتین برای mecA مثبت بودند. شیوع SE ها ۷۷.٦ %بود. در بین ژن‌هایی که انتروتوکسین‌های کلاسیک را کد می‌کنند، SEA بیشترین فراوانی را داشت و ۲۵.۵ درصد جدایه‌ها حامل آن بودند، پس از آن SEE در ۱۸.٤ درصد، SEDدر ۱۱.۲ درصد، SEC در ۵.۱ درصد و SEB در ٤.۱ درصد جدایه‌ها قرار داشتند. در بین انتروتوکسین های شناسایی شده، SEG ژن انتروتوکسین شناسایی شده غالب در ایزوله ها با شیوع ۳۵.۷ درصد بود. ژن SEH با شیوع ۱٪ و ژن SEI با ۳.۱٪ از دیگر انتروتوکسین های شناسایی شده با فراوانی پایین بودند (24).

مطابق با نتایج ما، نظری و همکاران پروفایل های ژن انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر خام ایران را مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند که ژن کد کننده انتروتوکسین A (SEA) شایع ترین (۱٦ ایزوله، ۳۰.۷٪) و پس از آن SEB شیوع بیشتری داشته است (25). شواهد نشان دهنده وجود ژن های مختلف SE در ۲۷ سویه (٤۵٪) بود. به طور مشابه، در مطالعه Bianchi و همکاران (26)، از ٤۸۱ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* آنالیز شده، تعداد ۲۵۵ (۵۳٪) سویه برای یک یا چند ژن SE مثبت بودند و در حالی که این نسبت در مطالعه نظری و همکاران حدود ۷٪ بود ژن SED قبلاً به عنوان شایع ترین نوع انتروتوکسین جدا شده، پس ازSEA ، در شیوع مسمومیت غذایی استافیلوکوکی شامل محصولات لبنی گزارش شده بود (28) (27). علیرغم تنوع قابل توجهی در شیوع ژن های انتروتوکسین در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* موجود در غذاها و بیووارهای مختلف، SEA به طور مداوم

بیشترین انتروتوکسین مشاهده شده در این میکروارگانیسم است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد شیوع انتروتوکسین های استافیلوکوکی در شیر خام گاو به ویژه با مشکل رو به رشد مقاومت ضد میکروبی، یک مسئله نگران کننده است. با تجزیه و تحلیل توزیع ژن های انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*، می توان اطلاعات اپیدمیولوژیک ارزشمندی را برای بهبود سلامت عمومی و ایمنی غذا به دست آورد. استفاده از مطالعات اپیدمیولوژیک بر پایه بررسی های دقیق مولکولی مانند Multiplex PCR نتایج امیدوارکننده ای را در جلوگیری از شیوع باکتری های بیماری زا و عفونی نشان داده است.

**فهرست منابع**


1. Chamari M, Anvar SAA, Pourahmad R, Nowruzi B, Yousefi S. Study of alginate-encapsulated phycoerythrin in promoting the biological activity of synbiotic ice cream with Lactobacillus casei. Scientific Reports. 2024;14(1):15471.
2. Nowruzi B, Anvar SAA, Shafaroodi A. Study of phycocyanin powder on probiotic bacteriologically and antioxidant properties of yogurt at 4° C. Nutrire. 2024;49(2):42.
3. Jalaliani H, Anvar S, Amini K, Karim G. Isolation and Characterization of Staphylococcus aureus from Raw Cow's Milk and Investigating the Effect of Bifidobacterium bifidum Probiotic Cell Free Supernatant on Their Enterotoxins Genes Expression. Archives of Razi Institute. 2023;78(6):1680.
4. Dimitreli G, Petridis D, Akakiadou P, Chrysalidou S. Effect of protein supplementation, fat globule size and storage time on the rheological and sensory properties of buffalo milk stirred yogurt. Journal of food research. 2014;3(5):31.
5. Ehsani A, Hashemi M, Jazani NH, Aliakbarlu J, Shokri S, Naghibi SS, editors. Effect of Echinophora platyloba DC. essential oil and lycopene on the stability of pasteurized cream obtained from cow milk. Veterinary Research Forum; 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
6. El Khoury A, Atoui A, Yaghi J. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. Food control. 2011;22(10):1695-9.
7. Deeth H, Datta N. Heat Treatment of Milk: Non-thermal Technologies: Introduction. 2011.
8. Demazeau G, Plumecocq A, Lehours P, Martin P, Couëdelo L, Billeaud C. A new high hydrostatic pressure process to assure the microbial safety of human milk while preserving the biological activity of its main components. Frontiers in public health. 2018;6:306.
9. Diab M, Hamze M, Bonnet R, Saras E, Madec J-Y, Haenni M. OXA-48 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in raw milk in Lebanon: epidemic spread of dominant Klebsiella pneumoniae clones. Journal of medical microbiology. 2017;66(11):1688-91.
10. Dai J, Wu S, Huang J, Wu Q, Zhang F, Zhang J, et al. Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus isolated from pasteurized milk in China. Frontiers in microbiology. 2019;10:641.
11. Ahmadi A, Anvar SAA, Nowruzi B, Golestan L. Effect of phycocyanin and phycoerythrin on antioxidant and antimicrobial activity of refrigerated low-fat yogurt and cream cheese. Scientific Reports. 2024;14(1):27661.
12. Salari Sharif A, Sattari M, Moradi M, Shahrokhabad R. Detection of Staphylococcus aureus Entrotoxin Genes A & B in Clinical Samples of the Patients Referring to the Medical Centers of Kerman

and Rafsanjan Cities by PCR Technique. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2012;11(2):128-36.
13. Sharif A, Sattari M, Moradi M, Shahrokhabad R. Detection of Staphylococcus aureus Entrotoxin Genes A&B in Clinical Samples of the Patients Referring to the Medical Centers of Kerman and Rafsanjan Cities by PCR Technique. IJMS. 2011:12-23.
14. Gadyari F, Sattari M, Boroumand MA, Yaghoubi R, Sepehriseresht S, Purgholi L. Detection of Staphylococcus aureus Entrotoxins A to D in clinical strains isolated from burned patients of Tehran Motahari Hospital. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2011;5(1):20-7.
15. Mohammad Hassanvand, Gholamreza Goudarzi, Sayyad Khanizadeh. The frequency of enterotoxin A and B genes among Staphylococcus aureus strains isolated from confectionary products and nares of its processing workers in Khorramabad city (2012). Pajoohande. 2014;19(5):281-6.
16. Matyi S, Dupre J, Johnson W, Hoyt P, White D, Brody T, et al. Isolation and characterization of Staphylococcus aureus strains from a Paso del Norte dairy. Journal of dairy science. 2013;96(6):3535-42.
17. Vasconcelos NG, Cunha MdLRdSd. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. 2010.
18. Puah SM, Chua KH, Tan JAMA. Virulence factors and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates in ready-to-eat foods: detection of S. aureus contamination and a high prevalence of virulence genes. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2016;13(2):199.
19. Spanu V, Spanu C, Virdis S, Cossu F, Scarano C, De Santis EPL. Virulence factors and genetic variability of Staphylococcus aureus strains isolated from raw sheep's milk cheese. International Journal of Food Microbiology. 2012;153(1-2):53-7.
20. Pal M, Kerorsa GB, Marami LM, Kandi V. Epidemiology, pathogenicity, animal infections, antibiotic resistance, public health significance, and economic impact of staphylococcus aureus: a comprehensive review. American Journal of Public Health Research. 2020;8(1):14-21.
21. Omwenga I, Aboge GO, Mitema ES, Obiero G, Ngaywa C, Ngwili N, et al. Staphylococcus aureus enterotoxin genes detected in milk from various livestock species in northern pastoral region of Kenya. Food Control. 2019;103:126-32.
22. Rodríguez-Lázaro D, Oniciuc E-A, García PG, Gallego D, Fernández-Natal I, Dominguez-Gil M, et al. Detection and characterization of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant S. aureus in foods confiscated in EU borders. Frontiers in microbiology. 2017;8:1344.
23. Valizadeh E, Amini K. Identification of Staphylococcus aureus enterotoxin genes using multiplex PCR. Journal of Babol University of Medical Sciences. 2016;18(12):26-32.
24. Mashouf RY, Hosseini SM, Mousavi SM, Arabestani MR. Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of Staphylococcus aureus strains isolated from animal originated foods in West of Iran. Oman medical journal. 2015;30(4):283.
25. Nazari R, Godarzi H, Baghi FR, Moeinrad M. Enterotoxin gene profiles among Staphylococcus aureus isolated from raw milk. Iranian journal of veterinary research. 2014;15(4):409.
26. Bianchi D, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products in Italy. Letters in applied microbiology. 2014;58(2):190-6.
27. Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R. Phenotypic and

genotypic characterization of Staphylococcus aureus strains from Italian dairy products. International Journal of Microbiology. 2009;2009.
28. Lawrynowicz-Paciorek M, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyga B.