ردیابی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیر گاومیش در استان خوزستان

آزاده مرادی فارسانی[۱]، امیر شاکریان[۲*]، ابراهیم رحیمی[۲]، حسن ممتاز[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳. استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: amshakerian@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۶/۶ پذیرش نهایی: ۹۷/۱/۲۵)

چکیده

شیر محیط غذایی مناسبی برای رشد باکتری‌ها است و می‌تواند سریعاً به انواع باکتری‌ها آلوده شود. باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* از جمله عوامل میکروبی آلوده‌کننده شیر است که باعث ایجاد بیماری در انسان می‌شود. با توجه به اهمیت انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* موجود در شیر به‌عنوان یکی از منابع عمده مسمومیت‌های غذایی، بررسی روش‌های متعدد جداسازی، شناسایی و دسته‌بندی انتروتوکسین‌ها ضروری می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیر خام گاومیش در استان خوزستان انجام شد. در این بررسی در سال ۱۳۹۵، تعداد ۱۰۰ نمونه از مراکز توزیع شیر خام گاومیش در استان خوزستان اخذ گردید. نمونه‌ها به روش کشت میکروبی و مولکولی ارزیابی و حضور ژن‌های مولد انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده، بررسی گردید. نتایج نشان داد که در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* تعداد ۷ نمونه مربوط به ژن انتروتوکسین SEA، که بالاترین تعداد و درصد توزیع بود. در حالی‌که ۲ نمونه دارای هر دو ژن انتروتوکسین‌های SEA و SEB بودند و ۲ نمونه دارای دو ژن انتروتوکسین‌های SEA و SEC و ۱ نمونه دارای چهار ژن انتروتوکسین‌هایSEC، SEB، SEA، SHE و ۲ نمونه دارای هر دو ژن انتروتوکسین‌های SEH و SEJ و ۱ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEJ و ۱ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEH و SEC بودند. حضور نسبتاً بالای ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی و نقش بالقوه انتروتوکسین در ایجاد مسمومیت‌های غذایی در انسان، نشان‌گر نقش شیر خام گاومیش به‌عنوان یکی از منابع آلوده کننده انسان بوده و لزوم پیشگیری از آلودگی‌های اولیه و ثانویه شیر به این باکتری را ایجاب می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس ارئوس*، انتروتوکسین، شیر گاومیش، خوزستان

مقدمه

استافیلوکوکوس ارئوس (*Staphylococcus aureus*) یک‌گونه باکتریایی بسیار مهم مولد مسمومیت غذایی در بسیاری از کشورهای جهان می‌باشد. این باکتری طیف وسیعی از توکسین‌ها را تولید می‌کند. در میان سموم تولید شده، انتروتوکسین‌ها اهمیت بسزایی دارند. این سموم پروتئین‌های محلول در آبی هستند که توسط سلول باکتری ترشح می‌شوند و به‌عنوان عامل استفراغ در مسمومیت‌های غذایی و گاستروآنتریت‌ها مطرح می‌باشد (Asna-ashari *et al*., 2012). انتروتوکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* برخلاف انتروتوکسین‌های کلاسیک مثل کلراتوکسین، روی سلول‌های پوششی عمل نمی‌کند، بلکه اثر استفراغ‌زایی آن‌ها به علت اثر روی عصب واگ و سمپاتیک است و بنابراین می‌توان سموم را به‌طور صحیح‌تر نوروتوکسین نامید. در ابتدا ۵ سروتیپ از انتروتوکسین‌ها تحت نام‌های A، B، C، D و E شناخته شده بودند (Ahmadi *et al*.,2013) و بعد از آن هم سروتیپ‌های G و H و اخیراً سروتیپ I گزارش گردیده‌اند. از میان این انتروتوکسین‌ها، انتروتوکسین‌های A، B، C، D و E انتروتوکسین‌های معمول یا کلاسیک نامیده می‌شوند و در این بین انتروتوکسین A بیش از همه تولید می‌شود (Aragon-Alegro *et al*., 2007). سویه‌های انتروتوکسین‌زای *استافیلوکوکوس ارئوس* می‌توانند به‌طور هم‌زمان یک یا چندین نوع از توکسین‌هایی را که از نظر سرولوژیکی متفاوت هستند، تولید کنند. روش استاندارد برای تشخیص سموم انتروتوکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* (SE) و پی بردن به وجود آن‌ها در مواد غذایی روش‌های ایمونولوژیکی، بیولوژیکی و سرولوژیکی می‌باشد. با این وجود روش‌های مولکولی برای تشخیص ژن‌های مولد سموم SE نیز به‌طور گسترده‌ایی توسعه یافته‌اند. در این میان روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR از اهمیت فراوانی برخوردارند (Borelli *et al*., 2006). تاکنون چند روش Multiplex PCR متفاوت برای شناسایی انتروتوکسین‌های کلاسیک باکتری پیشنهاد شده است (Korpysa-Dzirba *et al*., 2011). با توجه به اهمیت شیر گاومیش که مصرف جهانی و به‌ویژه آسیایی بعد از شیر گاو دارد و نیز مصرف بسیار آن در کشور ما، لذا اهمیت بررسی ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی جدا شده از شیر گاومیش را بسیار افزایش می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی و تنوع ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از شیر خام گاومیش‌های استان خوزستان به روش Multiplex PCR بود.

مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری نمونه‌ها

در این پژوهش تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام از پستان گاومیش‌های سالم استان خوزستان در سال ۱۳۹۵ اخذ و در ظروف سترون به مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید. نمونه‌های شیر خام گاومیش پس از سانتریفوژ کردن (۱۵۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه)، در محیط کشت آبگوشت قلب-مغز (Merck, Germany) به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند (Abbar, 2010).

- کشت، جداسازی و شناسایی *استافیلوکوکوس ارئوس*

برای شناسایی *استافیلوکوکوس ارئوس*های کوآگولاز مثبت، ابتدا نمونه‌ها در محیط غنی‌کننده جیولیتی کانتونی براث (Giolitti-Cantoni Broth) کشت شد (Merck, Germany) و به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند، سپس بر روی محیط کشت اختصاصی برد پارکر آگار (Merck, Germany) کشت داده شدند. پرگنه‌های سیاه‌رنگ، محدب، صاف و براق که واجد هاله شفاف در اطراف پرگنه بودند انتخاب و سایر آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر آزمون کواگولاز، کشت در محیط مانیتول سالت آگار، آزمون ذوب ژلاتین و آزمایش هیدرولیز اوره برای تأیید نهایی باکتری انجام شد (Bianchi *et al*., 2014).

- آزمایش‌های مولکولی

به‌منظور تأیید قطعی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* از روش PCR استفاده شد. ابتدا ایزوله‌ها در محیط آبگوشت قلب–مغز کشت و DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentas, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن 16S-rDNA *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده با روش PCR تأیید شدند (Kumar *et al*., 2010).

- ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس ارئوس*

برای ردیابی ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌ها، از زوج پرایمرهای جدول (۱) استفاده شد:

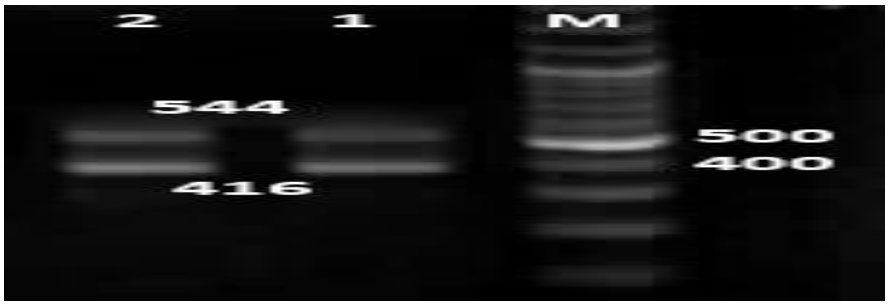
جدول (۱)- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن‌های کدکننده تولید انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس ارئوس*

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه محصول	منبع
sea	ESA1 ESA2	F; ACGATCAATTTTTACAGC R; TGCATGTTTTCAGAGTTAATC	٥٤٤	Rose *et al*., 2002
seb	ESB1 ESB2	F; GAATGATATTAATTCGCATC R; TCTTTGTCGTAAGATAAACTTC	٤١٦	
sec	ESC1 ESC2	F; GACATAAAAGCTAGGAATTT R; AAATCGGATTAACATTATCCA	٢٥٧	
sed	ESD1 ESD2	F; TTACTAGTTTGGTAATATCTCCTT R; CCACCATAACAATTAATGC	٣٣٤	
see	ESE1 ESE2	F; ATAGATAAAGTTAAAACAAGCAA R; TAACTTACCGTGGACCC	١٧٠	
seg	ESG1 ESG2	F; ACGTCTCCACCTGTTGAAGG R; TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	٤٠٠	
seh	ESH1 ESH2	F; TCACATCATGCGAAAGCAG R; TAGCACCAATCACCCTTTCC	٣٥٧	
sei	ESI1 ESI2	F; TGGAACAGGACAAGCTGAAA R; TAAAGTGGCCCCTCCATACA	٤٦٧	
sej	ESJ1 ESJ2	F; CAGCGATAGCAAAAATGAAACA R; TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA	٤٢٦	

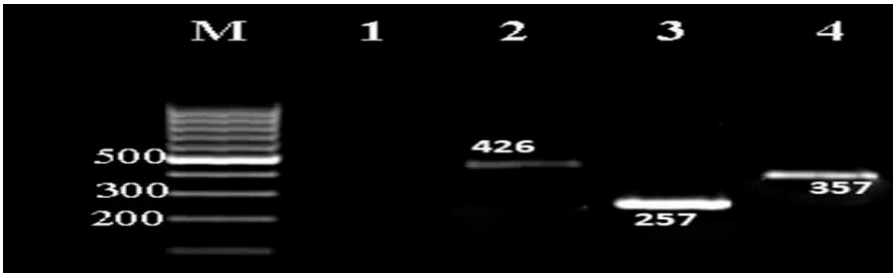
واکنش PCR برای ردیابی ژن‌های فوق در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرومول از هر کدام از پرایمرها، ۲۰۰ میکرومولdNTP، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ و ۱ نانوگرم DNA الگو و با برنامه حرارتی ۱ سیکل ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه، ۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت ٦۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ٦۰ ثانیه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (Asna-ashari *et al.*, 2012). الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد محلول رنگی DNA safe stain (سیناژن، ایران) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به‌مدت ۱ ساعت انجام گرفت. ژل مورد نظر با دستگاه ترانس لومیناتور UV مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

از تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام گاومیش مورد مطالعه، تعداد ۲۰ نمونه آلوده به استافیلوکوکوس ارئوس کواگولاز مثبت بودند که از این تعداد، ۱٦ جدایه حاوی ژن‌های مولد انتروتوکسین بودند که ۷ ایزوله دارای ژن انتروتوکسین SEA، ۲ ایزوله دارای هر دو ژن انتروتوکسین‌های SEA و SEB، ۲ ایزوله دارای دو ژن SEA و SEC و ۱ ایزوله دارای چهار ژن انتروتوکسین‌های SEA، SEB، SEC و SEH بودند. در شکل‌های (۱) و (۲) ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به تعدادی از نمونه‌های مورد مطالعه آورده شده است:



شکل (۱)- ژن‌های sea (قطعه ٥٤٤ جفت بازی) و seb (قطعه ٤١٦ جفت بازی) در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* (M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱ و ۲= ایزوله‌های مورد مطالعه)



شکل (۲)- ژن‌های sej (قطعه ٤٢٦ جفت بازی)، sec (قطعه ۲۵۷ جفت بازی) و seh (قطعه ۳۵۷ جفت بازی) در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* (M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱ تا ٤= ایزوله‌های مورد مطالعه)

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه بر روی مسمومیت‌های غذایی با منشأ *استافیلوکوکوس ارئوس* به قرن ۱۹ باز می‌گردد (Abbar, 2010). زمانی که به‌نظر می‌رسید شیر و فرآورده‌های آن اهمیت زیادی در خصوص چنین مسمومیت‌هایی دارند. بیشتر مطالعات آلودگی شیر را در مقایسه با سایر فرآورده‌های آن پایین‌تر گزارش کرده‌اند. اعتقاد بر این است که میزان آلودگی فرآورده‌های شیر به‌دلیل آلودگی‌هایی است که در طی فرآیند تولید آن‌ها اتفاق می‌افتد (Bennet *et al.*, 1986). تاکنون چندین مطالعه در خصوص میزان آلودگی شیرگ او به انواع ژن‌های مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* در دنیا و نیز در کشور ما انجام شده است (Rahimi, 2011). تاکنون مطالعات مشابه اندکی در خصوص فراوانی آلودگی در شیر گاومیش به انواع انتروتوکسین‌های تولید شده توسط *استافیلوکوکوس ارئوس* انجام شده به‌طوری‌که مطالعه مستقلی در این خصوص مشاهده نشده است. تعداد ۲۱ انتروتوکسین استافیلوکوکی شناسایی گردید که از این میان پنج انتروتوکسین A، B، C، D و E به‌عنوان انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی کلاسیک شناخته می‌شوند (Rahimi, 2011). که در پژوهش حاضر انتروتوکسین‌های A تا J مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه‌ای میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسین‌های معمول در *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز پرداختند که در این مطالعه توصیفی ۷۵ نمونه باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیر گاومیش برای بررسی وجود و حضور ژن‌های مربوط به انتروتوکسین‌های معمول *استافیلوکوکوس ارئوس* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که از این تعداد نمونه باکتریایی یک نمونه دارای هر دو ژن انتروتوکسین‌های SEB و SEC بود و سه نمونه دیگر فقط دارای ژن انتروتوکسین SEC بودند و ژن مربوط به انتروتوکسین SEA در هیچ‌کدام از نمونه‌ها شناسایی نشد (Asna-ashari *et al.*, 2012). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر به بررسی انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از فراورده‌های شیری سنتی و تجاری در بازار استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری پرداخت که مجموعاً ۲۰ نمونه از ۳٤۷ نمونه آلوده به *استافیلوکوکوس ارئوس* مثبت شدند که از این تعداد ۷ نمونه دارای ژن انتروتوکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* بودند که بیشترین درصد با تعداد ۳ نمونه مربوط به ژن انتروتوکسین SEC و ۲ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEA و ۱ نمونه دارای دو ژن SEA و SED و ۱ نمونه دارای دو ژن انتروتوکسین‌های SEA و SEC و دو ژن انتروتوکسین SEB و SEE منفی بودند (Rahimi, 2013). در پژوهشی دیگر ۸٤۸ نمونه شیر خام گاو و ۳۹۷ نمونه فرآورده‌ی شیری از نظر آلودگی به باکتری بررسی شدند که *استافیلوکوکوس ارئوس* از ٤۸۱ نمونه (۳۹ درصد) جدا گردید. تعداد ۲۵۵ نمونه (۵۳ درصد) از ٤۸۱ نمونه یاد شده، واجد ژن‌های کدکننده تولید انتروتوکسین بودند. هیچ‌یک از جدایه‌ها دارای ژن SEB و SEE نبودند. در بین انتروتوکسین‌های کلاسیک، بیشترین فراوانی به ژن SED (۲۵ درصد)

تعلق داشت (Bianchi *et al*., 2014). لذا در سایر فراورده‌های شیری از جمله پنیر نیز ممکن است علاوه بر شیر از منابع محیطی و هم‌چنین در نتیجه دست‌کاری افراد در طی روند تهیه و تولید آن، آلوده شده باشند. هم‌چنین آلودگی خامه و کشک به‌دلیل استفاده این فرآورده‌ها در برخی از غذاها می‌تواند مخاطره‌آمیز باشد (Rahimi, 2013). در بررسی دیگری که بر روی فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس ارئوس*‌های جدا شده از نمونه‌های شیر خام مربوط به التهاب پستان گاو تعداد ۵۰ نمونه مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا نمودند که ۱۲ نمونه دارای ژن انتروتوکسین‌های باکتری بودند که ۵ نمونه ژن‌های کدکننده انتروتوکسین SEC، ٦ نمونه ژن کدکننده انتروتوکسین SEG و ژن انتروتوکسین SEH در یکی از نمونه‌ها تعیین گردید. ژن‌های کدکننده مربوط به انتروتوکسین‌های SEA، SEB و SEE در هیچ کدام از ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس ارئوس* یافت نشدند (Ahmadi *et al*., 2013). بررسی حضور ژن‌های انتروتوکسین در میان *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیر خام گاوهای شهرستان قم پرداختند که مجموعاً ۵۲ نمونه از ۲٤٦ نمونه شیر خام اخذ شده آلوده به *استافیلوکوکوس ارئوس* بودند که از این تعداد همگی دارای ژن انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* بودند. تعداد ١٦ نمونه مربوط به ژن انتروتوکسین SEA که دارای بیشترین تعداد و درصد بود و کمترین درصد با ۱ نمونه مربوط به ژن انتروتوکسین SEI و ١٤ نمونه مربوط به ژن انتروتوکسین SEB و ۸ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SED و ٦ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEJ و ۸ نمونه دارای دو ژن انتروتوکسین‌های SEG و SEH بودند (Nazari *et al*., 2014). هم‌چنین بررسی وجود انتروتوکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* در شیرهای گاو، شتر، گوسفند، بز و گاومیش در تانک نگه‌داری شیر در استان چهارمحال و بختیاری پرداختند که ۲۲ نمونه از ۲۰۰ نمونه شیر خام آلوده به *استافیلوکوکوس ارئوس* مثبت شدند که از این تعداد ۱۵ نمونه دارای ژن انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* بودند. تعداد ٦ نمونه مربوط به ژن انتروتوکسین SEA که بیشترین درصد و تعداد متعلق به این ژن بود، ۱ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEB، ٤ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEC، ۳ نمونه واجد ژن انتروتوکسین SED، ۱ نمونه دارای دو ژن انتروتوکسین‌های SEA و SEC و ژن انتروتوکسین SEE منفی بود (Rahimi and Alian, 2013). در مطالعه‌ای در اصفهان در رابطه با شیوع ژن انتروتوکسین‌های کلاسیک *استافیلوکوکوس ارئوس* در فصول زمستان، بهار و تابستان مطالعه‌ای انجام دادند که از ۷۲ نمونه ۱۵ نمونه *استافیلوکوکوس ارئوس* مثبت بودند که همه ۱۵ نمونه، انتروتوکسین تولید کردند و بیشترین درصد مربوط به ژن انتروتوکسین SEA بوده و دو ژن انتروتوکسین SEB و SEE منفی بودند (Rahimi *et al*., 2012). در لهستان به بررسی شناسایی ژن کلاسیک انتروتوکسین استافیلوکوکی در *استافیلوکوکوس ارئوس* جدا شده از شیر خام گاو پرداختند که ۷۷ نمونه از ۲۳۷ نمونه مثبت شدند، از این تعداد ۵ نمونه دارای ژن انتروتوکسین بودند. تعداد ۳ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEC و ۲ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEA و ژن انتروتوکسین‌های SEB، SED و SEE منفی بودند (Korpysa-Dzirba and Osek, 2011). در بررسی دیگری به دو ژن انتروتوکسین SEA و SEB

پرداختند که از ۱۰۰ نمونه فراورده‌های شیر، ۳۲ نمونه *استافیلوکوکوس ارئوس* مثبت شدند که از این تعداد ۱٦ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEA و ۱۰ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEB و ٦ نمونه دارای هر دو ژن انتروتوکسین SEA و SEB بودند (Imani Fooladi *et al.*, 2010). این درحالی است که در پژوهش حاضر، تعداد ۷ نمونه دارای ژن انتروتوکسین SEA بودند که بیش‌ترین تعداد و درصد توزیع را داشت در حالی‌که ۲ نمونه دارای هر دو ژن انتروتوکسین‌های SEA وSEB، ۲ نمونه دارای دو ژن انتروتوکسین‌های SEA و SEC، ۱ نمونه دارای ژن انتروتوکسین‌های SEA، SEB، SEC و SEH و۲ نمونه دارای ژن انتروتوکسین‌های SEH و SEJ، ۱ نمونه دارای ژن انتروتوکسین‌های SEC و SEH، ۱ نمونه دارای ژن انترو توکسین SEJ بود. علت تفاوت در توزیع ژن‌های مولد انتروتوکسین در شیر خام گاومیش‌های استان خوزستان با سایر مطالعه‌ها، احتمالاً به‌دلیل نحوه نمونه‌گیری، انجام آزمایش، آلودگی ثانویه توسط افراد و پرورش‌دهندگان گاومیش و دخالت کمتر پرورش‌دهندگان گاومیش در ایجاد آلودگی ثانویه می‌باشد. گزارشات حاکی از آن است که عمده انتروتوکسین توسط *استافیلوکوکوس ارئوس*، انتروتوکسین A می‌باشد (Rahimi *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر ژن مواد انتروتوکسین A با فراوانی ٤۳/۸ درصد شایع‌ترین ژن ردیابی شده بود. از طرفی سویههای انتروتوکسین‌زای *استافیلوکوکوس ارئوس* می‌توانند یک یا چندین نوع از توکسین‌هایی را که از نظر سرولوژیکی متفاوت هستند هم‌زمان تولید کنند و در این مطالعه نیز حضور هم‌زمان این ژن‌ها در ایزوله‌های جدا شده ارزیابی گردید. با توجه به مقاومت انتروتوکسین به حرارت، شیر آلوده به این توکسین‌ها می‌تواند سلامت مصرف‌کننده را به خطر اندازد. با توجه به نتایج مطالعه می‌توان به این جمع‌بندی رسید که حضور نسبتاً بالای ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی و نقش بالقوه انتروتوکسین در ایجاد مسمومیت‌های غذایی در انسان نشان‌گر نقش شیر خام گاومیش به‌عنوان یکی از منابع آلوده کننده انسان می‌باشد از طرف دیگر انسان هم جزو منابع آلوده کننده شیر خام گاومیش بوده و لذا لزوم پیشگیری از آلودگی‌های اولیه و ثانویه شیر به این باکتری، درمان مناسب و به‌موقع دام‌های مبتلا به ورم پستان و به‌ویژه رعایت اصول بهداشتی در نگه‌داری و عمل‌آوری شیر را ایجاب می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از ریاست و کارکنان مجتمع آزمایشگاهی و مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و صنف پرورش‌دهندگان گاومیش در استان خوزستان اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Ahmadi, M and Dastmalchi-Saii, H. (2013). Detection of enterotoxin encoding genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk related bovine breast inflammation in a method PCR. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 9(3): 25-37. [In Persian]
- Asna-Ashari, M., Shaghayegh, J. and Ayatalah-Nasrolahi, A. (2012). Detection of enterotoxin encoding genes in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk buffalo in Tabriz. Journal of Food Hygiene, 2(2): 61-68. [In Persian]
- Abbar, M. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 3(2): 137-142.
- Aragon-Alegro, L.C., Mieko Konta, E.M., Suzuki, K., Silva, M.G., Júnior, A.F., Rall, R. et al. (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(6): 630–634.
- Bennet, R.W., Yeterian, M., Smith, W., Clos, C.M., Sassaman, M. and Mcclure, F.D. (1986). *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity, Journal Food Science, 51(5): 1337-1339.
- Bianchi, D.M., Gallina, S., Bellio, A., Chiesa, F., Civera, T. and Decastelli, L. (2014). Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. Letters in Applied Microbiology, 58(2): 190-196.
- Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Santos, D.A., Carmo, L.S., Dias, R.S. et al. (2006). Enteroxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese. Brazilian Journal of Microbiology, 37(4): 545-550.
- Imani Fooladi, A., Tavakoli, H. and Naderi, A. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 3(2): 137-42.
- Korpysa-Dzirba, W. and Osek, J. (2011). Identification of genes encoding classical *staphylococcal* enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 55(1): 55–58.
- Kumar, R., Yadav, B.R. and Singh, R.S. (2010). Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk mastitis crossbred cattle. Current Microbiology, 60(5): 379-386.
- Nazari, R., Godarzi, H., Rahimi Baghi, F. and Moeinrad, M. (2014). Enterotoxin gene profiles among *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk. Iranian Journal of Veterinary Research, 15(4): 409-12.
- Rahimi, E. (2013). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. Brazilian Journal of Microbiology, 44(2): 393-399.
- Rahimi, E. (2011). Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureu*s in raw sheep, goat, camel, and water buffalo milk by ELISA method. Comparative Clinical Pathology, 22(2): 181-184.
- Rahimi, E and Alian, F. (2013). Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. Veterinarski Arhiv, 83(1): 23-30.
- 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.
- Rosec, J.P. and Gigaud, O. (2002). *Staphylococcal* enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. International Journal of Food Microbiology, 77(1-2): 61-70.

Detection of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk buffalo in Khuzestan province

Moradi Farsani, A.[1] Shakerian, A.[2*], Rahimi, E.[2], Momtaz, H.[3]

1. MSc Graduate of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Professor of Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Professor of Department of Pathobiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

[*]Corresponding author's email: Amshakerian@yahoo.com
(Received: 2017/8/28 Accepted: 2018/4/14)

Abstract

Milk provides an ideal medium for bacterial growth and can be quickly infected with a variety of bacteria. *Staphylococcus aureus* is one of the major milk-borne pathogens. Considering the importance of *S. aureus* enterotoxins in milk as one of the main sources of food poisoning, it is necessary to isolate and to investigate various enterotoxins in foods. The present study was an attempt to detect enterotoxin encoding genes in *S. aureus* isolates obtained from buffalo raw milk in Khuzestan province. For this, 100 samples of buffalo milk were obtained from milk distribution centers in Khuzestan province in 2016. The samples were evaluated through microbial and molecular assays and the presence of enterotoxin-generating genes in *S. aureus* isolates. According to the results, 7 samples contained SEA enterotoxin gene, which accounts for the highest number and distribution percentage. Also, two samples had both SEA and SEB, 2 samples had both SEA and SEC enterotoxin genes, and 1 sample had four SEA, SEB, SEC and SEH enterotoxin genes, and two samples included both SEH and SEJ enterotoxins genes, and one sample included the SEJ enterotoxin gene and one sample included both SEH and SEC enterotoxin gene. The relatively high presence of Staphylococcal enterotoxins encoding genes and the potential role of enterotoxin in human food poisoning indicates the significant role of buffalo milk as one of the human infection sources and the necessity of taking measures to prevent primary and secondary milk contamination by this bacterium.

Conflict of interest: None declared.

Keywords*:* *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, Buffalo raw milk, Khuzestan