بررسی فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از نمونه‌های شیر مربوط به التهاب پستان گاو به روش PCR

ملاحت احمدی[۱*] و حبیب دستمالچی‌ساعی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۵

خلاصه

در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی مانند PCR به طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی ژن‌های مختلف در ارگانیسم‌ها به کار رفته است. هدف از تحقیق حاضر شناسایی ژن‌های مولد انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*، به عنوان یک عامل مهم بیماری‌زای انسان، در شیر با استفاده از روش PCR بود. نمونه‌های شیر از گاوداری‌های صنعتی تبریز (۵ گاوداری) و ارومیه (۴ گاوداری) اخذ گردید. روش‌های باکتریولوژیکی جهت جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* در مورد کلیه نمونه‌ها انجام گرفت. کلنی‌های زرد رنگ مانیتول مثبت در محیط مانیتول سالت آگار به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شد. سایر آزمون‌های بیوشیمیایی نیز جهت تشخیص انجام گرفت. جهت تایید تشخیص، استخراج DNA از تمامی جدایه‌ها انجام گرفت و آزمون PCR برای تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط پرایمرهای اختصاصی ژن *aroA*، صورت گرفت. جهت جستجوی ژن‌های مولد انتروتوکسین‌ها آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انتروتوکسین‌های A، B، C، D، E، G و H انجام گرفت. ژن‌های کد کننده انتروتوکسین C در ۵ جدایه (۳ مورد از ارومیه و ۲ مورد از تبریز)، انتروتوکسین G در ۶ جدایه (۲ مورد از ارومیه و ۴ مورد از تبریز) و انتروتوکسین H در یکی از جدایه‌های ارومیه تعیین گردیدند. ژن‌های کد کننده مربوط به انتروتوکسین‌های A، B ، C و E در هیچ‌کدام از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت نشدند. با توجه به اهمیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد التهاب پستان و نقش توکسین‌های متنوع تولید شده توسط این جرم در ایجاد بیماری در انسان و دام و عدم وجود اطلاعات کامل در مورد پراکندگی وجود توکسین‌های مذکور در بین سویه‌های جدا شده از موارد التهاب پستان در ایران، انجام مطالعات بیشتر در این ارتباط ضروری است.

کلمات کلیدی: انتروتوکسین، شیر، PCR ، *استافیلوکوکوس اورئوس*، ایران

مقدمه

التهاب پستان به وسیله طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ایجاد می‌شود، اما عفونت‌های پستانی ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* از اهمیت بسیار زیادی برخوردار بوده و در سراسر جهان و از آن جمله کشور ایران هر ساله خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را در اثر کاهش تولید شیر، کاهش کیفیت شیر، هزینه درمان و غیره به صنعت دامپروری وارد می‌سازد. عفونت بافت پستان گاو از نظر تهدید سلامت جامعه انسانی نیز اهمیت زیادی دارد. در حال حاضر با استفاده از روش‌های کنترلی جامع میزان بروز التهاب پستان در گاو کاهش یافته است، اما با این حال در طی مطالعات مختلف انجام شده مشخص گردیده است که *استافیلوکوکوس اورئوس* همچنان به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مهم در ارتباط با التهاب پستان بالینی و تحت بالینی در گاو مطرح می‌باشد (Radostis et al. 2007).

[۱*] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه E-mail: m.ahmadi@urmia.ac.ir (نویسنده مسئول)

[۲] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

استافیلوکوکوس اورئوس طیف وسیعی از توکسین‌های پروتئینی و نیز عوامل بیماری‌زای خارج سلولی تولید می‌نماید که به نظر می‌رسد در قدرت بیماری‌زایی باکتری موثر باشند. بعضی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* توکسین‌های تب‌زایی مثل انتروتوکسین استافیلوکوکی (SE) تولید می‌نمایند که در سندرم مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در انسان یا حیوانات و در بقاء *استافیلوکوکوس اورئوس* در غده پستان نقش دارند (Songer et al. 2005). انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی پروتئین‌های تک زنجیری با وزن مولکولی پایین می‌باشند که از نظر ترکیب و فعالیت بیولوژیکی مشابه هم بوده اما از نظر آنتی‌ژنی متفاوت می‌باشند. چندین انتروتوکسین استافیلوکوکی متفاوت از نظر سرولوژی شناسایی شده است که متشکل از انتروتوکسین‌های کلاسیک (A تا E) و انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی جدیداً توصیف شده (SEG تا SER و SEU) می‌باشند. چون انتروتوکسین‌های 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 انتروتوکسین‌ها بالا می‌باشد ولی حرارت دادن، با کاهش تعداد باکتری در شیر، میزان این توکسین‌ها را محدود می‌سازد. شیر جمع‌آوری شده از دامپروری‌های دارای گاوهای مبتلا به التهاب پستان باید به دقت کنترل گردد، زیرا شیر حاصل از چنین مراکزی منبع اصلی آلودگی فرآورده‌های لبنی می‌باشد. باید توجه داشت که جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین به ویژه انواع مولد انتروتوکسین A به عنوان یکی از عوامل اصلی مسمومیت غذایی می‌باشند. نتایج حاصل از تحقیقات مختلف شیوع بالای *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* مولد انتروتوکسین A (SEA) را در شیر گاوهای مبتلا به التهاب پستان و فرآورده‌های شیری تایید 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 (Fraser et al. 2000). تحقیق حاضر جهت تعیین فراوانی انواع ژن‌های مؤثر در تولید انتروتوکسین در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد التهاب پستان گاو و مشخص نمودن ژن انتروتوکسین غالب در بین جدایه‌های مورد مطالعه انجام گرفت.

روش کار

نمونه‌برداری

در این مطالعه از موارد بالینی و نیز تحت بالینی (به دنبال آزمایش CMT) التهاب پستان گاو با رعایت اصول دقیق نمونه‌گیری به روشی که توسط Sears و همکاران استفاده شده است، اقدام به اخذ نمونه شیر در ویال‌های استریل درپوش‌دار گردید (Sears et al. 1991). نمونه‌های شیر از ۹ گله واقع در شهرهای تبریز (۵ گله) و ارومیه (۴ گله) جمع‌آوری شدند. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر شیر از هر کارتیه شیر جمع‌آوری و درون لوله استریل ریخته شد و سپس نمونه‌های مربوط به هر گاو با هم مخلوط گردید و به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. در مجموع ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های شیر اخذ شده جدا گردید که جهت جستجوی ژن‌های مربوط به انتروتوکسین‌های A، B، C، D، E، G و H مورد مطالعه قرار گرفتند.

جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه روی محیط آگار خون‌دار (Merck, Germany) حاوی ۵٪ خون گوسفند کشت گردید. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پرگنه‌های به قطر ۴ میلی‌متر، گرد، صاف و براق با رنگ زرد طلایی با منطقه همولیز دوتایی به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شدند.

شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس خصوصیات همولیزی و مورفولوژی کلنی‌ها، آزمون کواگولاز، تولید DNase، تخمیر قند مانیتول، ایجاد

کلنی‌های سیاه در محیط Baird parker و مقاومت نسبت به پلی‌میکسین B انجام گرفت (Quinn et al. 1994 ، کارتر و وایز ۲۰۰۴).

استخراج DNA از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

استخراج DNA با تغییرات جزئی در روش توضیح داده شده توسط Meiri و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. این تغییرات شامل دو برابرسازی زمان سانتریفیوژ، مقدار آنزیم لیزوزیم (۲mg) و اضافه کردن مرحله نهایی شامل تغلیظ DNA به وسیله اتانل بود. رسوب DNA در ۱۰۰µl بافر TE برای استفاده در PCR حل شد و تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Meiri et al. 2002).

آزمون PCR برای تایید تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس*

آزمون PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن *aroA* *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شد که قبلاً توسط Marcos و همکاران در سال ۱۹۹۹ معرفی شده‌اند. توالی پرایمرهای مورد استفاده و اندازه تقریبی محصول به دست آمده در جدول ۱ آمده است. پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران – ایران) سنتز شدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن aroA و اندازه تقریبی محصول PCR (marcos et al. 1999)

نام پرایمر	توالی پرایمر	محصول PCR (bp)
aroA	F: 5'-AAG GGC GAA ATA GAA GTG CCG GGC-3′ R: 5'-CAC AAG CAA CTG CAA GCA T-3'	۱۱۵۳

تکثیر ژن *aroA* با استفاده از جفت پرایمر F و R منجر به تولید فرآورده‌ای با طول تقریبی ۱۱۵۳ جفت باز گردید که مورد انتظار بود. واکنش PCR با استفاده از کیت PCR ساخت شرکت سیناژن (CinnaGen PCR master kit) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، حاوی ۲۵ میکرولیتر از مستر میکس با غلظت 2X، ۰/۸ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۵ میکرولیتر از نمونه DNA انجام گرفت. حجم این مخلوط با استفاده از آب مقطر دو بار تقطیر دیونیزه به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر در دستگاه ترمال سایکلر ساخت شرکت Corbett استرالیا انجام شد. چرخه‌های PCR شامل مراحل دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، و ۳۲ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و اتصال پرایمرها در ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و امتداد در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه بود. در نهایت امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از سوش رفرانس *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 به عنوان نمونه کنترل و آب مقطر به عنوان کنترل منفی در تمام مراحل PCR استفاده شد (Marcos et al. 1999).

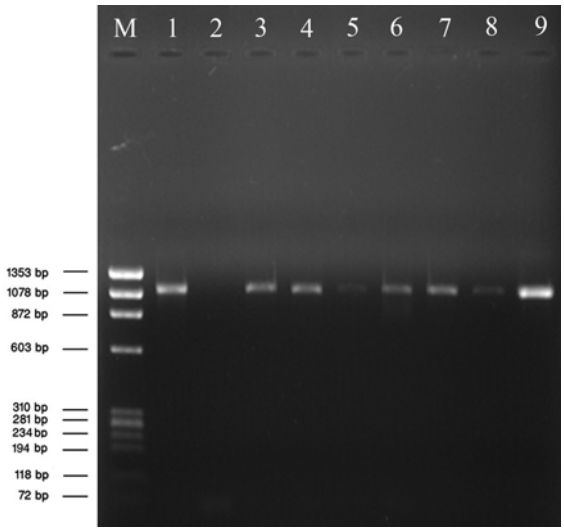
تشخیص ژن‌های کد کننده انتروتوکسین استافیلوکوکی با روش PCR

در این مرحله، از پرایمرهای اختصاصی مربوط به هر یک از انواع انتروتوکسین‌ها با توالی‌های ذیل و با چرخه‌های دمایی ارائه شده توسط Akineden و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Salasia و همکاران در سال ۲۰۰۴ استفاده گردید (Akinden et al. 2001 , Salisia et al. 2004). واکنش PCR برای هر یک از ژن‌های کد کننده انتروتوکسین به صورت جداگانه با استفاده از کیت ساخت شرکت سیناژن (CinnaGen, Iran) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس با غلظت 2X، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از جفت پرایمرهای مربوطه و ۴ میکرولیتر از DNA استخراج شده انجام گرفت.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مربوط به ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های مختلف و اندازه تقریبی محصولات PCR

نام پرایمر	توالی پرایمر	محصول PCR (bp)	منبع
sea **SEA-1** **SEA-2**	AAA GTC CCG ATC AAT TTA TGG CTA GTA ATT AAC CGA AGG TTC TGT AGA	۲۱۰	Salisia et al. 2004
seb **SEB-1** **SEB-2**	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	۴۷۸	Johnson et al. 1991
sec **SEC-1** **SEC-2**	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	۲۵۷	Johnson et al. 1991
sed **SED-1** **SED-2**	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	۳۱۷	Johnson et al. 1991
see **SEE-1** **SEE-2**	TAG ATA AGG TTA AAA CAA GC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	۱۷۰	Johnson et al. 1991
seg **SEG-1** **SEG-2**	AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC	۶۴۲	Larsen et al. 2002
seh **SEH-1** **SEH-2**	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG CAT CTA CCC AAA CAT TAG CAC C	۳۷۵	Larsen et al. 2002

پس از انجام PCR ، به منظور مشخص کردن اندازه محصولات تولید شده از روش الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲ درصد و مارکرهای DNA استفاده گردید. اندازه محصول ژن *aroA* در *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از مارکر ΦX174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) ساخت شرکت فرمنتاز آلمان مشخص گردید و اندازه باندهای حاصل از تکثیر ژن‌های مختلف مولد انتروتوکسین‌ها با استفاده از مارکرهای 100bp (SM0241-Fermentase,Germany) و 100bp Plus (SM0323-Fermentase, Germany) تعیین گردید.



تصویر ۱: تکثیر ژن aroA

M: مارکر ΦX174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) marker (Fermentas)

چاهک ۱: کنترل مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) ATCC 29213

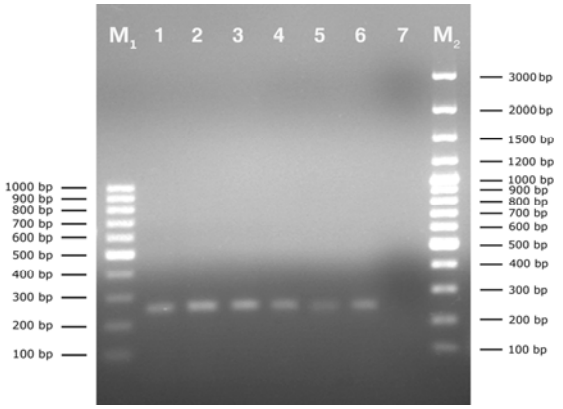
چاهک ۲: کنترل منفی

چاهک‌های ۹-۳: نمونه‌های مثبت

نتایج

در این تحقیق ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس آزمایشات بیوشیمیایی و حضور ژن *aroA* شناسایی (تصویر ۱) و جهت تعیین حضور ژن‌های مولد انتروتوکسین مورد مطالعه قرار گرفتند.

ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های مربوط به *sea* ، *seb* ، *sed* و *see* در هیچ‌کدام از ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت نشدند در حالی که، ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های C در ۵ جدایه (۳ مورد از ارومیه و ۲ مورد از تبریز)، G در ۶ جدایه (۲ مورد از ارومیه و ۴ مورد از تبریز) و H در یکی از جدایه‌ها (از ارومیه) تعیین گردیدند. نتایج مربوط به انتروتوکسین‌های *sec* (257bp) ، *seg* (642bp) و *seh* (375bp) به ترتیب در تصاویر ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است.



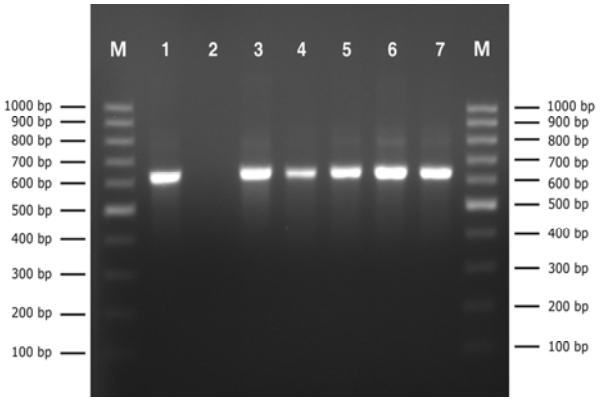
تصویر ۲: تکثیر ژن انتروتوکسین C

M_1: مارکر 100bp (SM0241- Fermentase, Germany)

M_2: مارکر 100bp Plus (SM0323-Fermentase, Germany)

چاهک ۱: نمونه کنترل مثبت چاهک ۷: کنترل منفی

چاهک‌های ۶-۲: نمونه‌های مثبت

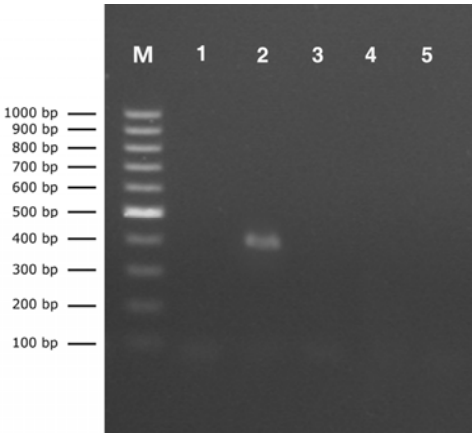


تصویر ۳: تکثیر ژن انتروتوکسین G

M: مارکر 100bp (SM0241-Fermentase, Germany)

چاهک ۱: کنترل مثبت چاهک ۲: کنترل منفی

چاهک‌های ۷-۳: نمونه‌های مثبت



تصویر ۴: تکثیر ژن انتروتوکسین H

M: مارکر 100bp (SM02-Fermentase, Germany)

چاهک ۲: نمونه مثبت چاهک ۱: کنترل منفی

چاهک‌های ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های منفی

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس متداول‌ترین عامل التهاب پستان واگیردار گاو می‌باشد که خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت گاوهای شیری وارد می‌سازد (Piccinini et al. 2010). اجرای برنامه‌های کنترلی جامع در ارتباط با التهاب پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند موجب افزایش تولید شیر و تامین ترکیب طبیعی آن شده و خسارات اقتصادی را به مقدار زیادی کاهش دهد. همچنین از نقطه نظر بهداشتی در گله و حفظ بهداشت جامعه انسانی، کنترل التهاب پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* امری ضروری به نظر می‌رسد. دسترسی به اطلاعات در ارتباط با ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی *استافیلوکوکوس اورئوس* در درک بهتر نحوه بیماری‌زایی این جرم لازم و ضروری است. این امر در تسهیل کنترل و انجام تحقیق در زمینه جلوگیری از عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در گله‌های شیری نیز مؤثر است. در این مطالعه ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های شیر، از ۹ گله واقع در مناطق تبریز (۵ گله) و ارومیه (۴ گله) جدا گردید. شناسایی بر مبنای خصوصیات بیوشیمیایی و نیز تائید وجود ژن *aroA* با PCR بود.

در این مطالعه قطعه‌ای با اندازه مورد انتظار ۱۱۵۳ جفت باز از همه جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمد. نتایج حاصل از سایر مطالعات نیز نشان داده‌اند که تکثیر ژن *aroA* از طریق PCR از اختصاصیت بالایی جهت شناسایی گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* برخوردار بوده و می‌توان از آن به عنوان روشی مؤثر جهت شناسایی این گونه استفاده نمود، به طوری که روش شناسایی مبتنی بر ژن *aroA* می‌تواند به عنوان یک روش ملکولی تکمیلی برای آزمایشات فنوتیپی جهت شناسایی سریع جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های بیولوژیکی مختلف مثل شیر، خون، زخم، گوش، ادرار و چشم مورد استفاده قرار گیرد (El-Huneidi et al. 2006).

استافیلوکوکوس اورئوس طیف گسترده‌ای از عوامل حدت از قبیل کوآگولاز، همولیزین‌ها، انتروتوکسین‌ها، توکسین‌های اکسفولیاتیو، توکسین-۱ سندرم شوک توکسیک و غیره تولید می‌کند، که این تنوع می‌تواند دلیل توانایی *استافیلوکوکوس اورئوس* برای تکثیر و ایجاد عفونت در میزبان‌های مختلف باشد (Monecke et al. 2007). روش‌های مختلفی جهت شناسایی قابلیت تولید توکسین‌ها وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به ایمونودیفوزیون، آگلوتیناسیون و الیزا اشاره نمود. این روش‌ها اغلب امکان شناسایی غلظت‌های بسیار کم توکسین و شناسایی سویه‌هایی با توانایی تولید بالقوه توکسین را ندارند، لذا شناسایی مستقیم ژن کد کننده انتروتوکسین‌ها با استفاده از روش PCR معیار مناسبی جهت مشخص نمودن قابلیت تولید توکسین توسط یک سویه می‌باشد (Schmitz et al. 1998). در مطالعه حاضر ۵۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد التهاب پستان گاو از نظر وجود ژن‌های مولد انتروتوکسین با بکارگیری روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

در مطالعه‌ای که توسط Naffa و همکاران در سال ۲۰۰۶ انجام گرفت از ۱۰۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده، ۲۳ جدایه حاوی ژن‌های *sea* ، *sec* و یا هر دو بوده‌اند به طوری که ۱۵ جدایه از کل جدایه‌ها از نظر داشتن ژن *sea* مثبت بوده و ژن *sec* در ۴ جدایه و وجود همزمان هر دوی ژن‌های *sea* و *sec* نیز در ۴ جدایه گزارش گردیده است. در مطالعه انجام شده توسط محققین فوق، در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ژن *sea* در مقایسه با بقیه ژن‌های مؤثر در تولید انتروتوکسین غالب بوده است (Naffa et al. 2006). نتایج مشابهی در ارتباط با غالب بودن ژن *sea* در بین جدایه‌های با منشاء انسانی توسط Becker و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Mehrotra و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش گردیده است. با این حال Larsen و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داده‌اند که ژن *sec* در بین جدایه‌های با منشاء گاوی معمول‌تر است.

در مطالعه‌ای که توسط Akineden و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام گرفته است، مشخص شده است که انتروتوکسین‌های G ، I و J بیش از سایر انواع انتروتوکسین در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد التهاب پستان گاو شایع می‌باشند.

نتایج حاصل از مطالعات محققین مختلف نشان داده‌اند که استافیلوکوک‌های تولید کننده انتروتوکسین در شیر حاصل از موارد التهاب پستان گاوی به میزان زیاد حضور دارند. میزان شیوع عادی چنین سویه‌هایی در کشور آلمان ۵۸/۷٪ ، در امریکا ۱۳/۸٪ و در کره ۲۸/۳٪ گزارش گردیده است (Zschoch et al. 2005, Katsuda et al. 2005, Lim et al. 2004).

در مطالعه‌ای که توسط Haveri و همکاران انجام گرفته است، از ۱۱۹ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از التهاب پستان گاو، ۹۲ جدایه (۷۷/۳٪) قابلیت تولید انتروتوکسین را داشته و در این بین *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* مولد انتروتوکسین A (SEA) در مقایسه با بقیه غالب بوده است. همچنین این محققین نشان داده‌اند که انتشار وسیع سویه‌های مولد انتروتوکسین در شیر خطر حضور چنین سویه‌هایی را در فرآورده‌های غذایی افزایش می‌دهد هر چند که میزان آن در مقایسه با خود شیر پایین

است (Haveri et al. 2007). تصور می‌شود که منبع اصلی آلودگی شیر غیر پاستوریزه، شیر دامپروری‌هایی است که دارای گاوان مبتلا به التهاب پستان می‌باشند (Holeckova et al. 2002). محققین مختلفی وجود میزان بالایی از سویه‌های مولد انتروتوکسین را در دامپروری‌های دارای گاوان مبتلا به ورم پستان گزارش کرده‌اند (Cenci-Goga et al. 2003). در طی مطالعات و بررسی‌های انجام شده توسط مجریان تحقیق، هیچ‌گونه سابقه علمی از موضوع مطرح شده در کشور ایران وجود ندارد.

نتایج مطالعات فوق که توسط محققان مختلف انجام گرفته است نشان دهنده اختلاف در پراکندگی ژن‌های مؤثر در تولید انواع انتروتوکسین در بین جدایه‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که این امر احتمالاً از تفاوت‌های جغرافیایی و نیز اختلاف در منشاء اکولوژیکی سویه‌های جدا شده (شیر، انسان و دام‌های مختلف) ناشی می‌شود. همچنین الگوی عفونت داخل پستانی *استافیلوکوکوس اورئوس* اغلب از گله‌ای به گله دیگر متفاوت است و این الگوها می‌تواند به تفاوت‌های بین سویه‌ای (Joo et al. 2001 , Zecconi et al. 2003)، ویژگی‌های جغرافیایی و خصوصیات میزبان و بافت مربوطه بستگی داشته باشد (Van Leeuwen et al. 2005).

با توجه به اهمیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد التهاب پستان و نقش توکسین‌های متنوع تولید شده توسط این جرم در ایجاد بیماری در انسان و دام و عدم وجود اطلاعات کامل در مورد پراکندگی وجود توکسین‌های مذکور در بین جدایه‌های حاصل از موارد التهاب پستان، انجام مطالعات جامع در مورد انتشار ژن‌های مولد انتروتوکسین در گله‌های دیگر مناطق مختلف دو استان با تعداد نمونه بیشتر توصیه می‌گردد. همچنین برای به دست آوردن اطلاعات کامل در ارتباط با ژن‌های مذکور می‌توان بررسی‌های بیشتری در مناطق مختلف کشور و نیز در جدایه‌های به دست آمده از منابع دامی دیگر انجام داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه که هزینه این تحقیق را تأمین نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع

احمدی ملاحت و دستمالچی‌ساعی حبیب (۱۳۸۷). اصول باکتری شناسی دامپزشکی، تألیف کارتر جی آر و وایز د جی، انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه صفحات ۴۴۳-۴۲۹ و ۴۶۴-۴۵۲.

Akinden O., Annemuller C., Hassan A.A., Lamller C., Wolter W. and Zschock M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 8: 959-964.

Becker K., Friedrich A.W., Lubritz G., Weilert M., Peters G. and Von Eiff C. (2003). Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. Journal of Clinical Microbiology, 41: 1434-1439.

Cenci-Goga B.T., Karama M., Rossitto P.V., Morgante R.A. and Cullor J.S. (2003). Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. Journal of Food Protection, 66: 1693-1696.

El-Huneidi W., Bdour S. and Mahasneh A. (2006). Detection of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* and of a novel *aroA* genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagnostic Microbiology and Infectious disease, 56: 127-132.

Fraser J., Arcus V., Kong P., Baker E. and Proft T. (2000). Superantigens powerful modifiers of the immune system. Molecular Medicine Today, 6(3):125-132.

Haveri M., Roslof A., Rantala L. and Pyprala S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. Journal of Applied Microbiology, 103: 993-1000.

Holeckova B., Holoda E., Fotta M., Kalinacova V., Gondol J. and Grolmus J. (2002). Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. Annual Agricultural Environmental Medicine, 9: 179-182.

Johnson W.M., Tyler S.D., Ewan E.P., Ashton F.E., Pollard D.R. and Orzee K.R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins and toxic shock syndrome toxin 1, in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 29(3): 131-138.

Joo Y., Fox L., Davis W., Bohach G. and Park Y. (2001). *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. Veterinary Microbiology, 80: 131-138.

Katsuda K., Hata E., Kobayashi H., Kohmoto M., Kavashima K., Tsunemitsu H., et al. (2005). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. Veterinary Microbiology, 105: 301-305.

Larsen H.D., Aarestrup F.M. and Jensen N.E. (2002). Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and β-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. Veterinary Microbiology, 85: 61–67.

Lim S.K., Joo Y.S., Moon J.S., Lee A.R., Nam H.M., Wee S.H., et al. (2004). Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. Journal of Veterinary Medicine Sciences, 66: 581-584.

Marcos C.H., Ramos S., Smeltzer M.S. and Carrasco G.N. (1999). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. Journal of Clinical Microbiology, 37: 570-574.

Mehrotra M., Wang G. and Johnson W.M. (2000). Muliplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* entrotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. Journal of Clinical Microbiology, 38: 1032-1035.

Meiri-Bendeck I., Lipkin E., Friedmann A., Leitner G., Saran A., Friedmann A., et al. (2002). A PCR- based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. Journal of Dairy Science, 85: 1717-1723.

Monecke S., Kuhnert P., Hotzel H., Slickers P. and Ehricht R. (2007). Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. Veterinary Microbiology, 125: 128–140.

Naffa R.G., Bdour S.M., Migdadi H.M. and Shehabi A.A. (2006). Enterotoxicity and genetic variation among clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Jordan. Journal of Medical Microbiology, 55: 183-187.

Piccinini R., Borromeo V. and Zecconi A. (2010). Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence. Veterinary Microbiology, 4817: 22-27.

Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. and Carter G.R. (1994). Clinical veterinary microbiology, 1st ed. London, Mosby, pp.: 44-53.

Radostis O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. and Constable P.D. (2007). Veterinary Medicine.10th ed. Washington, Saunders, pp :673-674.

Salisia S.I., Khusnan Z., Lammler C. and Zschock M. (2004). Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indinesis and Hesse Germany. Journal of Vetrinary sciences, 5:103-109.

Schmitz F.J., Veldkamp K.E., Van Kessel K.P.M., Verhoef J. and Van Strijp J.A.G. (1998). Delta toxin from *Staphylococcus aureus* as a co-stimulator of human neutrophil oxidative burst. Journal of Infectious Disease, 176:1531-1537.

Sears P.M., Wilson D.J., Gonzalez R.N. and Hancock D.D. (1991). Microbiological results for milk samples obtained premilking and post milking for the diagnosis of bovine intramammary infections. Journal of Dairy Science, 74(12): 4183-4188.

Songer J.G. and Post K.W. (2005). Bacterial and fungal agents of animal disease. Veterinary Microbiology. 1st ed. Washington, Saunders, pp: 67-75.

Van Leeuwen W.B., Melles D.C., Alaidan A., Al-Ahdal M., Boelens H.A.M., Snijders S.V., et al. (2005). Host- and tissue- specific pathogenic straits of *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 187: 4584–4591.

Zecconi A., Piccinini R. and Fox L.K. (2003). Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during a control program in nine commercial dairy herds. Journal of the American Veterinary Medical Association, 223: 684–688.

Zschoch M., Kloppert B., Wolter W., Hamman H.P. and Lammler C.H. (2005). Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Veterinary Microbiology, 108(3-4): 243-249.

Detection of the enterotoxin-producing genes in *staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk by PCR in Tabriz and Urmia regions

Ahmadi M.[1] and Dastmalchi Saei H.[2]

Received: 25.01.2012 Accepted: 5.11.2012

Abstract

Recently molecular methods, such as PCR have been used successfully for the identification of different genes in microoganisms. The aim of this study was to detect the enterotoxin-producing genes in *Staphylococcus aureus* as major human pathogens in cattle milk samples by PCR. Milk samples were collected from individual cattle in industrial dairy herds of Tabriz (5 herds) and Urmia (4 herds). In order to isolation of *S. aureus* by cultural methods, bacteriological examinations were done on all samples. Yellow colored colonies which were mannitol positive on mannitol salt agar, suspected as *S. aureus*. Biochemical tests were used for the presumptive identification of all suspected isolates. Based on the presence of *aroA* gene which encodes the enzyme 5-enolpyruvylshikmate-3-phosphate synthase (EPSPS), 50 *S. aureus* were confirmed. *S. aureus* ATCC 29213 used as positive control.
DNA extracted from all isolates and the PCR carried out using specific primers for *S. aureus* enterotoxins (A-H). Among the total of 50 *S. aureus* isolates, 5 were positive for *sec* (3 from Urmia and 2 from Tabriz), 6 were positive for *seg* (2 from Urmia and 4 from Tabriz) and one isolate from Urmia was positive for *seh* gene. The genes for *sea, seb, sed,* and *see* were not detected in any of isolates. The results of this study revealed that enterotoxin-producing genes are present in the milk samples of different regions. In order to have more information about the distributions of the enterotoxin-producing genes in *S. aureus*, more investigations should be done on more samples from Urmia and Tabriz and also other regions of Iran.

Key words: Enterotoxin, Milk, PCR, *Staphylococcus aureus,* Iran

1- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran