تعیین فراوانی ژن‌های *sea* و *seb* در نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر ورم پستانی گاو، گوسفند و بز در شهرستان سنندج

الهام احمدی[۱*]، عباس قوزیوندی[۲]، کاظم ابراهیم‌پورباصر[۲] و هیوا کریمی‌دره‌آبی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۶

خلاصه

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی مسمومیت غذایی در انسان مطرح است. علت اصلی این مسمومیت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی هستند که به انواع مختلفی وجود دارند. از یک سو با توجه به نقش احتمالی شیر آلوده با سویه‌های انتروتوکسین‌زای این باکتری در بروز مسمومیت غذایی در انسان و نقش مهم انتروتوکسین‌های A و B در بیماری‌زایی روده‌ای باکتری و اهمیت مضاعف انتروتوکسین B به عنوان نوعی سلاح بیولوژیک و از سوی دیگر عدم وجود اطلاعات جامع در مورد نقش شیر و دو نوع انتروتوکسین مذکور در تهدید سلامت عمومی در منطقه‌ی سنندج، هدف از این مطالعه تعیین فراوانی ژن‌های *sea* و *seb* ، به عنوان فراوان‌ترین انتروتوکسین‌ها از جنبه‌ی درمانگاهی می‌باشد. تعداد ۱۲۰ نمونه شیر گاو و ۶۰ نمونه شیر گوسفند و ۶۰ نمونه شیر بز در شرایط استریل جمع‌آوری و به منظور تعیین حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط روش‌های روتین باکتریولوژیکی بررسی گردیدند. جدایه‌ها با روش PCR مبتنی بر ژن ترمونوکلئاز (*nuc*) تأیید و برای شناسایی ژن‌های *sea* و *seb* با استفاده از روش مولکولی ارزیابی شدند. در مجموع ۲۳/۳۳ درصد (۲۸ مورد) از نمونه‌های شیر گاو، ۳۱/۶۶ درصد (۱۹ مورد) از نمونه‌های شیر گوسفند و ۲۱/۶۶ درصد (۱۳ مورد) از نمونه‌های شیر بز با *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند. ۱۰۰ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشا گاوی دارای ژن *sea* و فاقد *seb* بودند. *sea* به ترتیب در ۷۸/۹۴ درصد (۱۵ مورد) و ۲۳/۰۷ درصد (۳ مورد) از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشا گوسفندی و بزی و *seb* به ترتیب در ۱۰/۵۲ درصد (۲ مورد) و ۳۰/۷۸ درصد (۴ مورد) از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشا گوسفندی و بزی شناسایی گردید. حضور درصد بالای ژن‌های انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر یک فاکتور خطر احتمالی برای سلامت مصرف‌کننده لحاظ می‌شود. لذا بهبود کیفیت بهداشتی شیر در منطقه‌ی مورد مطالعه ضروری است.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین، شیر ورم پستانی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس نوعی باکتری گرم مثبت است که با تولید عوامل حدت متعدد باعث ایجاد بیماری‌های مختلفی در انسان و دام می‌شود (Bystron et al. 2009). مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در انسان با علایم حالت تهوع، استفراغ حاد، دل‌درد و اسهال، ۱ تا ۸ ساعت پس از مصرف غذای آلوده توسط سویه‌های انتروتوکسین‌زای باکتری ایجاد می‌گردد. علیرغم بیماری خفیف و خودمحدود شونده با میزان مرگ و میر پایین، این بیماری در سرتاسر جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها از جنبه‌ی بهداشت عمومی و اقتصادی مطرح می‌باشد (Rall et al. 2008). توکسین‌های روده‌ای مترشحه از *استافیلوکوکوس اورئوس*، پروتئین‌های با وزن مولکولی کم (۲۹۶۰۰-۲۶۹۰۰ دالتون) و مقاوم به حرارت هستند که فعالیت بیولوژیکی خود را حتی پس از فرآوری

[۱*] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی

E-mail: elham.ahmadi.vet@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی

[۳] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی

حرارتی مواد غذایی و از آن جمله پاستوریزاسیون، حفظ می‌کنند. به عنوان مثال، انتروتوکسین A استافیلوکوکی پس از ۲۸ دقیقه حرارت دیدن در ۱۲۱ درجه‌ی سانتی-گراد همچنان فعال باقی می‌ماند (Pelisser et al. 2009). همچنین این توکسین‌ها نسبت به غیرفعال‌سازی توسط پروتئازهای معده‌ای-روده‌ای از جمله پپسین مقاوم هستند. علاوه بر ماهیت سمیت برای دستگاه گوارش، انتروتوکسین‌های این باکتری به عنوان توکسین‌های تب‌زا عمل و باعث سرکوب سیستم ایمنی و تکثیر غیراختصاصی لنفوسیت‌های T شده و به دلیل این اثرات سوپرآنتی‌ژن نامیده می‌شوند (Pelisser et al. 2009). بر اساس تفاوت‌های سرولوژیکی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs)، ۵ نوع انتروتوکسین کلاسیک، SEA تا SEE، شناسایی شده است که مسئول ۹۵ درصد موارد شیوع مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌باشند و ۵ درصد باقیمانده توسط انتروتوکسین‌های غیرکلاسیک ایجاد می‌گردد (Pinto et al. 2005).

SEA به عنوان فراوان‌ترین عامل مسمومیت غذایی استافیلوکوکی و SEB به دلیل قابلیت استفاده به عنوان نوعی سلاح بیولوژیکی در بیوتروریسم، مهم‌ترین انتروتوکسین‌های این باکتری قلمداد می‌گردند. انتروتوکسین B علاوه بر راه گوارشی، به صورت آئروسل و از طریق تنفسی نیز می‌تواند باعث ایجاد سندرم شوک توکسیک شود و به همین علت سویه‌های مولد این توکسین توسط مؤسسه‌ی بین‌المللی آلرژی و بیماری‌های عفونی[1] به عنوان پاتوژن‌های با درجه‌ی اولویت B طبقه-بندی می‌شوند (Ahanotu et al. 2006).

با توجه به شیوع ورم پستان استافیلوکوکی در جمعیت دام‌های اهلی شهرستان سنندج و نیز تولید محصولات لبنی غیرپاستوریزه در این منطقه امکان ورود انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی به زنجیره‌ی غذایی انسان با احتمال زیادی مطرح است. به علاوه با توجه به تنوع جغرافیای گسترده در پراکندگی سویه‌های انتروتوکسین-زای *استافیلوکوکوس اورئوس* و نبود اطلاعات کافی در مورد نقش شیرهای آلوده استافیلوکوکی و انتروتوکسین-های باکتری در ایجاد بیماری در انسان، در این تحقیق به شناسایی مولکولی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و ژن-های مولد انتروتوکسین‌های A و B، به عنوان مهم‌ترین انتروتوکسین‌های مترشحه از این باکتری، در نمونه‌های شیر در شهرستان سنندج پرداخته شده است.

مواد و روش کار

در طی یک تحقیق میدانی-مقطعی تعداد ۱۲۰ نمونه شیر گاوی و تعداد ۶۰ نمونه شیر گوسفندی و ۶۰ نمونه شیر بزی در بازه‌ی زمانی ۶ ماهه، از دی ماه ۱۳۹۳ تا خرداد ۱۳۹۴، از دام‌های شهرستان سنندج جمع‌آوری و شماره‌گذاری گردید. قبل از نمونه‌گیری انتهای کارتیه‌ها با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد استریل و چند قطره‌ی اول دوشش دور ریخته شده و سپس نمونه‌ی شیر در ظروف نمونه‌گیری دربدار استریل ریخته شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج منتقل و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه روی محیط آگار خوندار (Merck, Germany) حاوی ۵ درصد خون استریل گوسفندی (بهارافشان، ایران) کشت گردید. پلیت‌ها به مدت ۳۶ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پرگنه‌های با قطر حدود ۴ میلی‌متر، گرد، صاف و براق با رنگ زرد طلایی به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شدند. شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس خصوصیات همولیز و مورفولوژی کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و تخمیر قند مانیتول انجام شد (Quinn 2011). تمام جدایه‌ها پس از تعیین هویت تا شروع مراحل مولکولی در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) و در

1- National Institute for Allergy and Infectious Diseases

حضور ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی-گراد نگهداری شدند.

به منظور استخراج DNA باکتری از کیت استخراج ژنومی باکتری‌های گرم مثبت شرکت ویژن پارس دلتا (DELTA^{TM} Life science, Iran) و براساس پروتکل شرکت سازنده‌ی کیت استفاده گردید. به منظور تأیید کارایی مرحله‌ی استخراج و تشخیص کیفیت DNA استخراجی، الکتروفورز نمونه‌های استخراجی بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

به منظور تأیید مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از تکثیر ژن *nuc* استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده شامل Forward primer: 5′-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3′ و Reverse primer: 5′-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3′ می‌باشد (Brakstad et al. 1992).

واکنش تکثیر در میکروتیوب‌های ۰/۲ میکرولیتری و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و در دستگاه ترموسایکلر BioRad T100 (USA) انجام گردید. مخلوط PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X آماده (0.08 units/µl Taq DNA polymerase in reaction buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0.4 mM of each dNTP) (CinnaGen, Iran)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای آغازگر (با غلظت ۰/۴ میکرومول)، ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده (با غلظت ۵۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه دوبار تقطیر بود. چرخه‌ی دمایی واکنش تکثیر ژن *nuc* شامل مراحل دناتوریزاسیون اولیه در ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ بار تکرار مراحل دناتوریزاسیون در ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و امتداد در ۷۲°C به مدت ۵۰ ثانیه، و مرحله‌ی امتداد نهایی در ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه می‌باشد (Brakstad et al. 1992). محصول حاصل از تکثیر بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید و در حضور 100 bp DNA ladder (CinnaGen, Iran) در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید. کنترل مثبت مورد استفاده سویه‌ی استاندارد ATCC 33591 و کنترل منفی مسترمیکس فاقد DNA بود.

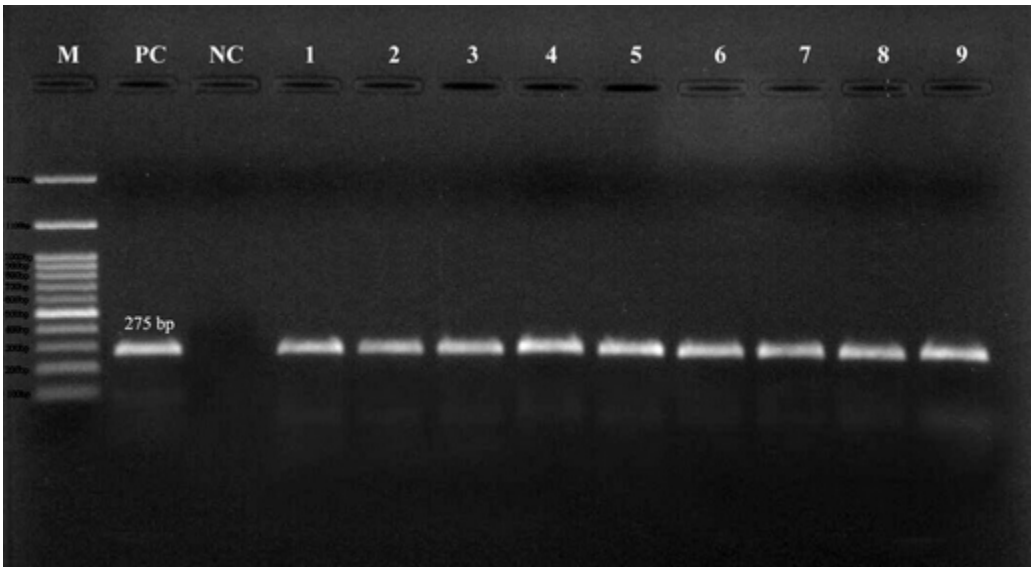
در مورد نمونه‌های تأیید شده به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش تکثیر مولکولی ژن *nuc*، وجود ژن انتروتوکسین A و B توسط جفت پرایمرهای اختصاصی بررسی گردید. برای تشخیص ژن *sea*، از جفت پرایمر دارای توالی sea_1:TTGGAAACGGTTAAAACGAA و sea_2:GAACCTTCCCATCAAAAACA و برای تشخیص ژن *seb*، از جفت پرایمر با توالی seb_1:TCGCATCAAACTGACAAACG و seb_2:GCAGGTACTCTATAAGTGCC استفاده شد (Johnson et al. 1991). واکنش PCR برای هر یک از ژن‌های *sea* و *seb* به صورت جداگانه با استفاده از کیت شرکت سیناژن (CinnaGen, Iran) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X (0.08 units/µl Taq DNA polymerase in reaction buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0.4 mM of each dNTP) (CinnaGen, Iran)، ۰/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای مستقیم و معکوس (با غلظت ۰/۵ میکرومول) و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده (با غلظت ۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. چرخه‌ی دمایی واکنش PCR ژن‌های *sea* و *seb* شامل مراحل دناتوریزاسیون اولیه در ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ بار تکرار مراحل دناتوریزاسیون در ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۵°C به مدت ۴۵ ثانیه و امتداد در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و مرحله‌ی امتداد نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه می‌باشد (Johnson et al. 1991). محصول تکثیر بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید و در حضور bp DNA ladder 100 (CinnaGen, Iran) مرئی شد. کنترل مثبت مورد استفاده در چرخه‌ی تکثیر ژن‌های *sea* و *seb* به ترتیب شامل سویه‌های استاندارد ATCC 13565 و ATCC 14458 و کنترل منفی مسترمیکس فاقد DNA بودند.

نتایج

در این تحقیق تعداد ۲۸ جدایه (۲۳/۳۳ درصد) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های شیر گاو و تعداد ۳۲ جدایه (۲۶/۶۶ درصد) باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌های شیر گوسفند و بز، شامل ۳۱/۶۶ درصد (۱۹ مورد) از نمونه‌های شیر گوسفند و ۲۱/۶۶ درصد (۱۳ مورد) از نمونه‌های شیر بز، جمع‌آوری از شهرستان سنندج براساس روش‌های فنوتیپی و حضور ژن *nuc* (شکل ۱) شناسایی و جهت تعیین وجود ژن‌های مولد انتروتوکسین A و B مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گاو، ژن *sea* در ۱۰۰ درصد جدایه‌ها شناسایی شد؛ در حالی که تمام جدایه‌ها فاقد ژن *seb* بودند. در مورد ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشا گوسفند و بز، ژن *sea* در ۱۸ مورد و ژن *seb* در ۶ مورد ردیابی گردید که به تفکیک در جدول ۱ آورده شده است. محصول تکثیر *sea* قطعه‌ای با اندازه‌ی bp ۱۲۰ (شکل ۲) و در مورد *seb* قطعه‌ای به اندازه‌ی bp ۴۷۸ (شکل ۳) می‌باشد.

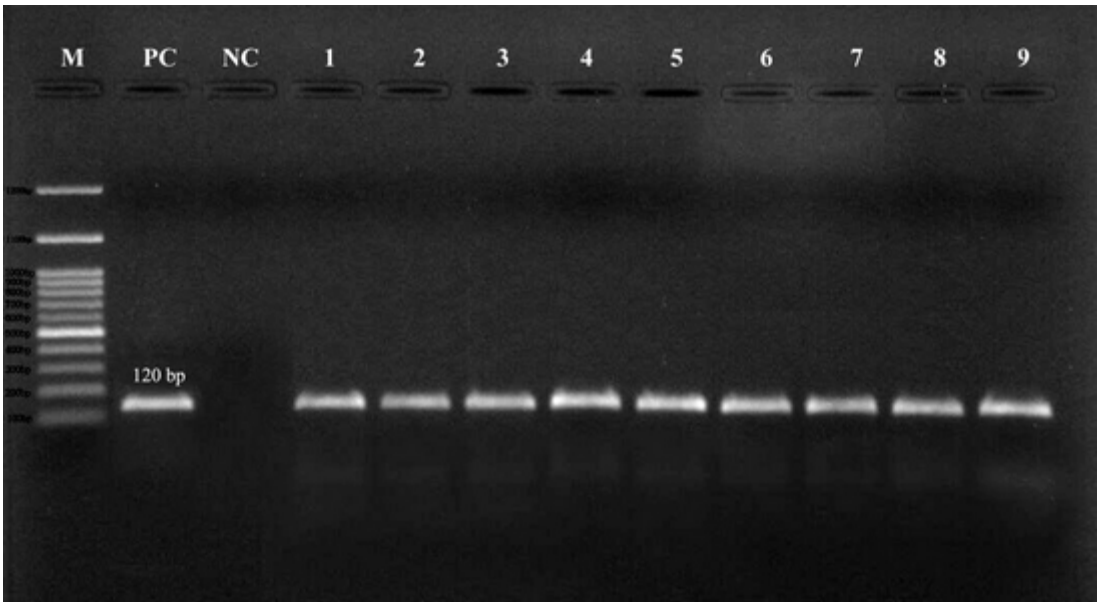
جدول ۱: تعداد و درصد فراوانی ژن‌های *sea* و *seb* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر ورم پستانی گوسفند و بز در شهرستان سنندج

نوع ژن	تعداد و درصد فراوانی ژن در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشای گوسفندی	تعداد و درصد فراوانی ژن در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشای بزی
sea	۱۵ (۹۴/۷۸ درصد)	۳ (۰۷/۲۳ درصد)
seb	۲ (۵۲/۱۰ درصد)	۴ (۷۸/۳۰ درصد)



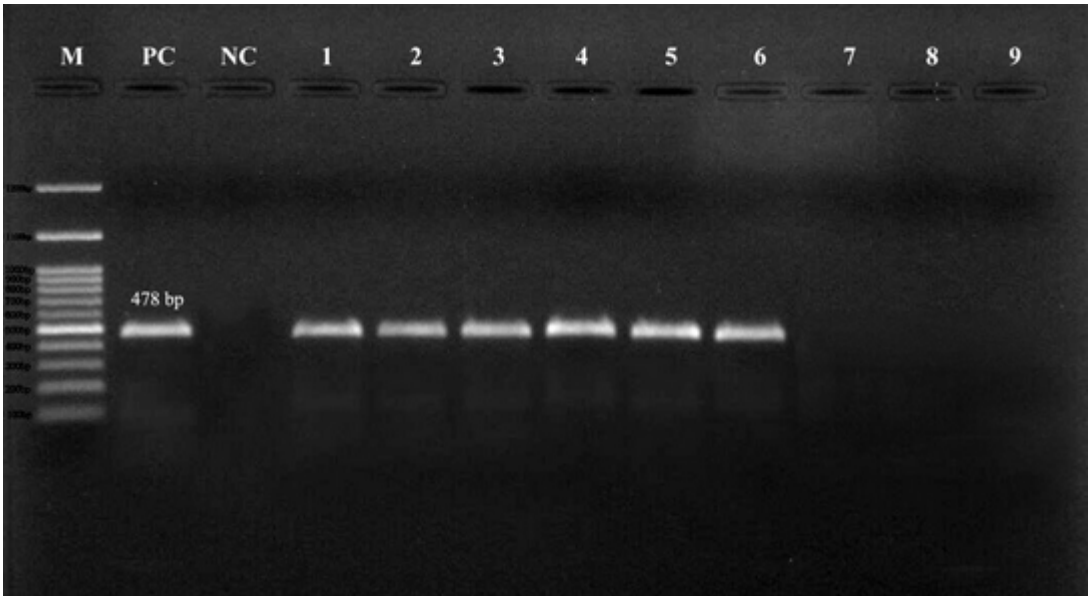
شکل ۱: تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *nuc* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

M=100 bp Marker (CinnaGen, Iran), PC=Positive Control, NC=Negative Control, Lanes 1-9=275 bp *nuc* PCR product



شکل ۲: تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *sea* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

M=100 bp Marker (CinnaGen, Iran), PC=Positive Control, NC=Negative Control, Lanes 1-9= 120 bp *sea* PCR product



شکل ۳: تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *seb* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

M=100 bp Marker (CinnaGen, Iran), PC=Positive Control, NC=Negative Control, Lanes 1-6= 478 bp *seb* product

بحث

جدایه‌های درمانگاهی *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر به تولید طیف وسیعی از توکسین‌ها و عوامل حدت هستند که در بیماری‌زایی جرم مؤثر می‌باشند (Ono et al. 2008). قوانین بهداشتی ایران هیچ نوع محدودیتی را برای میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر تعیین نکرده است و لذا شیر خام می‌تواند به یکی از راه‌های مهم ورود انتروتوکسین به چرخه‌ی غذایی انسان باشد. این باکتری علاوه بر حضور بر روی پوست سرپستانک و یا در داخل

کانال پستانی، می‌تواند به صورت اگزوژن و از طریق دستگاه شیردوشی، فومیت‌ها، حوله مورد استفاده برای خشک کردن سرپستانک‌ها، دست شیردوش و غیره به دام‌ها منتقل و باعث ایجاد ورم پستان درمانگاهی و تحت درمانگاهی گردد (Anderson et al. 2012). در نتیجه عفونت‌های استافیلوکوکی در دام از یک سو با ایجاد خسارات اقتصادی گسترده به صنعت دامپروری و از سوی دیگر با احتمال ایجاد مسمومیت غذایی ناشی از اگزوپروتئین‌های انتروتوکسین همواره از دو جنبه‌ی دامپزشکی و بهداشت عمومی حائز اهمیت بوده است. اگر چه ۵ نوع انتروتوکسین کلاسیک و حدود ۱۵ نوع انتروتوکسین غیرکلاسیک وجود دارند، در این مطالعه فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های A و B به عنوان مهم‌ترین انتروتوکسین‌های این باکتری، بدون در نظر گرفتن بیان و یا عدم بیان ژن‌ها، در نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز در شهرستان سنندج بررسی گردید. از مجموع ۱۲۰ نمونه شیر خام گاو و ۱۲۰ نمونه شیر خام گوسفند و بز، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از تعداد ۲۸ نمونه شیر گاو و ۳۲ نمونه شیر گوسفند و بز به روش باکتریولوژیکی و مولکولی شناسایی و تأیید گردید. فراوانی ژن *sea* در جدایه‌های گاوی ۱۰۰ درصد و فراوانی ژن *sea* و *seb* در مجموع جدایه‌های با منشا گوسفند و بز به ترتیب ۵۶/۲۵ درصد و ۱۸/۷۵ درصد بودند. اغلب ژن‌های کد کننده‌ی انتروتوکسین‌ها بر روی عوامل ژنتیکی متحرک[1] نظیر پلاسمیدها، پروفاژها و جزایر پاتوژنیک استافیلوکوکی[2] قرار دارند (Srinivasan et al. 2006). انتقال افقی عوامل ژنتیکی متحرک یکی از روش‌های کسب این فاکتورهای حدت در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* است (Gill et al. 2005). احتمال می‌رود که یکی از دلایل وجود ژن *sea* در ۱۰۰ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشا گاوی به دلیل وجود ژنوتیپ‌های محدود باکتری در جمعیت گاوهای شهرستان سنندج و انتقال افقی این ژن در بین آن‌ها باشد (Katsuda et al. 2005, Mellmann et al. 2008).

اگر چه نقش انتروتوکسین‌ها در حدت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دام نامشخص است، با این وجود استافیلوکوک‌های دارای ژن‌های انتروتوکسین از نمونه‌های شیر ورم پستانی درمانگاهی و تحت درمانگاهی به فراوانی جدا می‌شوند. در بررسی نمونه‌های شیر گاوی در ارومیه، میزان شیوع آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۱ درصد گزارش شده است؛ با این وجود در هیچ یک از جدایه‌ها ژن‌های *sea* و *seb* حضور نداشته و فقط در ۵ مورد از مجموع ۵۰ جدایه، *sec* در دسته‌ی ژن‌های انتروتوکسین‌های کلاسیک ردیابی شده است (Ahmadi and Dastmalchi Saei 2013). همچنین در محصولات لبنی تهیه شده از شیر گاو به روش سنتی در تهران، در ۳۲ درصد نمونه‌ها آلودگی با *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش و ژن *sea* در ۱۵/۶ درصد و ژن *seb* در ۹/۳ درصد شناسایی شده است (Imani-Fooladi et al. 2010). در استان فارس میزان آلودگی با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر گاو ۱۶ درصد و در نمونه‌های شیر گوسفند ۱۰ درصد و با فراوانی ۵۰ درصد *sea* در آن‌ها گزارش شده است (Rahimi and Alian 2013). فراوانی کلی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر شهرستان ماکو نسبتا بالا (۴۲/۷ درصد) گزارش شده است که علت احتمالی آن را شیوع بالای ورم پستان تحت درمانگاهی ناشی از این باکتری عنوان کرده‌اند (Sadeghi 2015). از مجموع ۳۷ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر ورم پستان گاوی در کره، در ۳۶ مورد *sea* و در ۳ مورد *seb* شناسایی شده است (Lim 2004). بر خلاف مطالعه‌ی حاضر که فراوانی ژن *sea* بیش‌تر از *seb* می‌باشد در مطالعه‌ای که بر روی ۵۲ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گوسفندی در شمال فلسطین انجام شده

1- Mobile genetic elements
2- Staphylococcal pathogenic islands

است، غالب نمونه‌ها (۵۴/۱ درصد) دارای ژن *seb* بوده‌اند (Adwan et al. 2005). در طی تحقیقی که در چین انجام شده است مشخص گردیده که ۶۵ درصد سویه‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر گاو دارای ژن‌های انتروتوکسین می‌باشند که بیش‌ترین فراوانی (۳۶ درصد) مربوط به *sea* بوده و همچون مطالعه‌ی حاضر *seb* در هیچ یک از جدایه‌ها شناسایی نشده است (Chen et al. 2009). علت تفاوت در فراوانی این ژن‌ها در مطالعات مختلف را می‌توان به تفاوت در شیوع جغرافیایی و دوره‌ای *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌زا در مناطق مختلف نسبت داد (Hwang et al. 2010).

اگر چه امکان شناسایی ژن‌های مولد انتروتوکسین به روش ایمنولوژیکی همچون الایزا، لاتکس آگلوتیناسیون، لاتکس ایمنواسی و ایمنوکروماتوگرافی به صورت تجاری وجود دارند اما این تست‌ها دارای حساسیت‌های مختلفی بوده و نتایج حاصل از آن‌ها وابسته به میزان بیان ژن و تولید محصول پروتئینی انتروتوکسین است (Wu et al. 2016)؛ در نتیجه سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌زا با قابلیت تولید سطوح کم توکسین‌های ترشحی (کم‌تر از میزان آستانه‌ی تشخیص تست) و یا در صورت وجود آنتی‌ژن‌های ایجاد کننده‌ی واکنش‌های متقاطع به دقت توسط این روش‌ها شناسایی نمی‌شوند (Van Belkum 2003). مزیت غالب روش PCR در شناسایی ژن‌های مولد انتروتوکسین در این است که امکان شناسایی سویه‌های دارای ژن‌های SE را مستقل از میزان بیان آن‌ها فراهم ساخته و نیز به دلیل تکثیر اختصاصی ژن، نتایج مثبت تنها در صورت وجود ژن مورد مطالعه ایجاد می‌شود. از سوی دیگر، شناسایی ژن در روش مولکولی لزوماً به معنی بیان آن ژن و تولید محصول پروتئینی نمی‌باشد زیرا عوامل مختلفی همچون تعداد باکتری (cfu/ml)، فاکتورهای محیطی شامل درجه‌ی حرارت، pH، میزان آب فعال و فاکتورهای وابسته به میزبان در بیان ژن مؤثر می‌باشند (Loncarevic et al. 2005). در نتیجه همراهی روش‌های ایمنولوژیکی و مولکولی امکان شناسایی دقیق ژن و میزان بیان آن را به صورت همزمان فراهم ساخته و لذا نتایج حاصله می‌تواند با احتمال بیش‌تری در پیش‌بینی نقش ژن‌های انتروتوکسین در بروز مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی در انسان قابل استناد باشند.

بر اساس نتایج فوق آلودگی شیرهای خام در شهرستان سنندج به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به اثبات رسیده است. با توجه به وجود ژن انتروتوکسین در ۱۰۰ درصد ایزوله‌های با منشای گاوی و ۷۵ درصد ایزوله‌های با منشای گوسفندی-بزی، نقش بالقوه‌ی این باکتری در ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در شهرستان سنندج حائز اهمیت می‌باشد. لذا شناسایی و درمان سریع و مؤثر عفونت‌های پستان در دام‌های اهلی نه تنها در کاهش خسارات اقتصادی، بلکه در حفظ سلامت انسان و بهداشت عمومی نیز مؤثر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات سرکار خانم مهندس فاطمه خان‌محمدی و جناب آقای مهندس علی کاظم‌نیا تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Adwan, G.; Abu-Shanab, B. and Adwan, K. (2005). Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. Turkish Journal of Biology, 29: 229-232.

Ahanotu, E.; Alvelo-Ceron, D.; Ravita, T. and Gaunt, E.D. (2006). Staphylococcal enterotoxin B as a biological weapon: recognition, management, and surveillance of staphylococcal enterotoxin. Applied Biosafety, 11(3): 120-126.

Ahmadi, M. and Dastmalchi Saei, H. (2013). Detection of the enterotoxin-producing genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk by PCR in Tabriz and Urmia regions. Iranian Journal of Veterinary Research, 9 (3): 27-35. (in persian)

Anderson, K.L.; Lyman, R.; Moury, K.; Ray, D.; Watson, D.W. and Correa M.T. (2012). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. Journal of Dairy Science, 95 (9): 4921-4930.

Brakstad, O.G.; Aasbakk, K. and Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. Journal of Clinical Mirobiology, 30 (7): 1654-1660.

Bystroń, J.; Bania, J.; Lis, E.; Molenda, J. and Bednarski M. (2009). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cow's milk. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 53: 59-63.

Chen, F.J.; Hiramatsu, K.; Huang, I.W.; Wang, C.H. and Lauderdale, T.L. (2009). Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin susceptible mecA-positive methicillin-resistant *S. aureus*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 65 (4): 351-357.

Gill, S.R.; Fouts, D.E.; Archer, G.L.; Mongodin, E.F.; Deboy, R.T.; Ravel, J. et al. (2005). Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. Journal of Bacteriology, 187 (7): 2426-2438.

Hwang, S.Y.; Park, Y.K.; Koo, H.C. and Park, Y.H. (2010). spa typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. The Journal of Veterinary Science, 11 (2): 125-131.

Imani-Fooladi, A.A.; Riazipour, M. and Sattari, M. (2010). Molecular and serological detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from traditionally dairy products. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 11 (4): 19-26. (in persian)

Johnson, W.M.; Tyler, S.D.; Ewan, E.P.; Ashton, F.E.; Polland, D.R. and Rozee, K.R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, 29(3): 426-430.

Katsuda, K.; Hata, E.; Kobayashi, H.; Kohmoto, M.; Kawashima, 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(3-4): 301-305.

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

Loncarevic, S.; Jorgensen, H.J.; Lovseth, A.; Mathisen, T. and Rorvik, L.M. (2005). Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. Journal of Applied Microbiology, 98(2): 344-350.

Mellmann, A.; Weniger, T.; Berssenbrügge, C.; Keckevoet, U.; Friedrich, A.W.; Harmsen, D. et al. (2008). Characterization of clonal relatedness among the natural population of *Staphylococcus aureus* strains by using spa sequence typing and the BURP (based upon repeat patterns) algorithm. Journal of Clinical Microbiology, 46 (8): 2805-2808.

Ono, H.K.; Omoe, K.; Imanishi, K.; Iwakabe, Y.; Hu, D.L.; Kato, H. et al. (2008). Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. Infection and Immunity, 76: 4999-5005.

Pelisser, M.R.; Klein, C.S.; Ascoli, K.R.; Zotti, T.R. and Arisil, A.C.M. (2009). Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. Brazilian Journal of Microbiology, 40 (1): 145-148.

Pinto, B.; Chenoll, E. and Aznar, R. (2005). Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR based techniques. Systemic and Applied Microbiology, 28 (4): 340-352.

Quinn, P.J. *Staphylococcus aureus*. In: Carter, J.R. and Wise, D.G. (2011). Principles in Veterinary Medicine. 3rd ed. London, Mosby, Pp: 306-316.

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.

Rall, V.L.; Vieira, F.P.; Rall, R.; Vieitis, R.L.; Fernandes, A.J.; Candeias, J.M. et al. (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. Veterinary Microbiology, 132 (3-4): 408-413.

Sadeghi, M.R. (2015). The prevalence of Enterotoxigenic Isolates of *Staphylococcus aureus* in Bovine and Sheep Bulk Tank Milk Samples of Maku. Journal of Veterinary Microbiology, 11 (1): 27-38. (in persian)

Srinivasan, V.; Sawant, A.A.; Gillespie, B.E.; Headrick, S.J.; Ceasaris, L. and Oliver, S.P. (2006). Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. Foodborne Pathogenic Disease, 3 (3): 274-283.

Van Belkum, A. (2003). Molecular diagnostics in medical microbiology: yesterday, today, and tomorrow. Current Opinion in Pharmacology, 3 (5): 497-501.

Wu, S.; Duan, N.; Gu, H.; Hao, L.; Ye, H.; Gong, W. et al. (2016). A review of the methods for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins, 8 (7): 176-196.

Identification of *sea* and *seb* frequency in *Staphylococcus aureus* isolated from cow, sheep and goat mastitic milk samples in Sanandaj city

Ahmadi, E.[1]; Ghuzivandi, A.[2]; Ebrahim Pourbaser, K.[2] and Karimi Dareabi, H.[1]

Received: 12.01.2017 Accepted: 28.10.2017

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most important causes of food poisoning in human. The main etiological agent, staphylococcal enterotoxins (SEs) are in different types. Based on the plausible role of contaminated milk with enterotoxigenic strains of this bacterium in human food poisoning and the important role of SEA and SEB in bacterial intestinal pathogenesis, plus with the multiple role of SEB as a biological weapon on one hand, and the lack of any data on the role of milk and the two mentioned enterotoxins in public health threatening in Sanandaj on the other hand, this study was aimed to determine the prevalence of *sea* and *seb* genes, as the most clinically important enterotoxins in mastitic milk samples. 120 cow, 60 sheep, and 60 goat mastitic milk samples were collected under sterile conditions and analyzed for the presence of *S. aureus* by routine bacteriological methods. The isolates were confirmed by thermonuclease (*nuc*)-based PCR and were evaluated for detection of *sea* and *seb* genes using molecular technique. Totally, 23.33% (28 numbers) of cow milk, 31.66% (19 numbers) of sheep milk, and 21.66% (13 numbers) of goat milk samples were contaminated with *S. aureus*. Among the bovine originated *S. aureus*, 100% were found to harbor *sea* with no *seb*. *sea* was detected in 78.94% (15 numbers) and 23.07% (3 numbers) of *S. aureus* isolates with ovine and caprine origins, respectively, and *seb* was detected in 10.52% (2 numbers) and 30.78% of *S. aureus* with ovine and caprine origins, respectively. The high percentage of SE genes in *S. aureus* isolated from milk samples constitutes a potential risk for consumers′ health. Therefore, improving the hygienic quality of milk is essential in the mentioned area.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, mastitic milk, Polymerase chain reaction (PCR)

1- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

2- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Corresponding Author: Ahmadi, E., E-mail: elham.ahmadi.vet@gmail.com