

## مطالعه فراوانی شش ژن مولد آنروتوکسین در استافیلوکوکوس آرتوس های جدا شده از پنیرهای محلی به روش Multiplex PCR

سامان مهدوی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه، استادیار گروه میکروبیولوژی، مراغه، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: S.mahdavi@iau-maragheh.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۲/۹/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۳/۳/۲۸)

### چکیده

با توجه به اهمیت آنروتوکسین های استافیلوکوکوس آرتوس به عنوان یکی از عوامل عمده مسمومیت های غذایی، بررسی روش های متعدد نظیر جداسازی، شناسایی و دسته بندی این آنروتوکسین ها ضروری است. در این تحقیق ۲۲ سویه باکتری استافیلوکوکوس آرتوس کوآگولاز مثبت جدا شده از پنیرهای سنتی روستاهای شهرستان مراغه برای بررسی وجود شش ژن آنروتوکسین با استفاده از روش Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا DNA نمونه ها استخراج شده و سپس Multiplex PCR برای حضور ژن های آنروتوکسین a, b, g, h, i و j بر روی نمونه ها انجام شد. در بین ژن های آنروتوکسین مورد آزمایش ژن Seg با بیشترین فراوانی (۸ سویه) و ژن Seb با کمترین فراوانی (منفی) گزارش شد. در ۹ مورد (۴۰/۹٪) از جدایه ها، ژن های آنروتوکسین مورد آزمایش مشاهده شد. چهار مورد (۱۸/۱۸٪) دارای بیش از یک نوع ژن آنروتوکسین بودند. نتایج مطالعه نشان داد اکثر استافیلوکوکوس آرتوس های جدا شده از پنیرهای محلی دارای پتانسیل تولید آنروتوکسین می باشند.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس آرتوس، ژن آنروتوکسین، پنیر، Multiplex PCR

### مقدمه

کشورها از نظر وقوع در لیست سه مسمومیت درجه اول قرار دارد (رضویلر، ۱۳۸۱). این باکتری طیف وسیعی از ترشحات سمی را تولید می نماید. در میان سموم تولید شده، آنروتوکسین ها دارای اهمیت بسزایی هستند. آنروتوکسین ها پروتئین های نسبتاً مقاوم به

استافیلوکوکوس آرتوس یک گونه باکتریایی بسیار مهم مولد مسمومیت غذایی در بسیاری از کشورهای جهان می باشد. مسمومیت حاصل از این باکتری، یکی از شایع ترین مسمومیت های غذایی است و در اغلب

با توجه به عدم رعایت شرایط بهداشتی مناسب در طی شیردوشی و نیز عدم حرارت دادن مناسب شیر قبل از تهیه پنیر سنتی در روستاها و مصرف بالای پنیرهای محلی در ایران، بررسی ژن های مولد آنروتوکسین های استافیلوکوکی جدا شده از پنیرهای محلی بسیار حائز اهمیت می باشد. هدف از انجام این تحقیق، تعیین فراوانی شش ژن مولد آنروتوکسین در استافیلوکوکوس آرنوس های جدا شده از نمونه های پنیر محلی روستاهای شهرستان مراغه به روش Multiplex PCR بود.

## مواد و روش ها

### نمونه ها

تعداد ۲۲ سویه باکتری استافیلوکوکوس آرنوس کوآگولاز مثبت جدا شده به عنوان نمونه مورد استناد در این مطالعه استفاده شد.

### استخراج DNA

استخراج DNA از ۲۲ نمونه کشت داده شده باکتری استافیلوکوکوس آرنوس کوآگولاز مثبت در محیط آبگوشت قلب- مغز (شرکت Merck، کشور آلمان) انجام شد. یک میلی لیتر از کشت های باکتریایی با شدت  $5 \times 10^8$  به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از افزودن ۱ میلی لیتر بافر لیزکننده شامل تریس ۱ مولار (pH=۷/۵)، کلریدسدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، C-TAB ۲ درصد بر روی رسوب مخلوط، در دمای  $85^\circ C$  به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد و سپس ویال های حاوی سلول های لیز شده به مدت ۵ دقیقه با شدت  $12000 \times g$  سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال های دیگر منتقل و هم حجم آن کلروفرم - ایزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲۴ به آن اضافه و

حرارت بوده و تقریباً به طور انحصاری توسط سویه های کوآگولاز مثبت استافیلوکوکوس آرنوس تولید می شوند و به عنوان عامل استفراغ در مسمومیت های غذایی و گاستروانتریت ها مطرح می باشند (ملکزاده، ۱۳۸۱). آنروتوکسین استافیلوکوکی (SE) برخلاف آنروتوکسین های دیگر مثل کلراتوکسین روی سلول های اپتیلیال عمل نکرده بلکه اثر استفراغزایی آنها به علت اثر روی عصب واگ و سمپاتیک است و بنابراین می توان سموم SE را به طور صحیح تر نورو توکسین نامید (رضویلر، ۱۳۸۱). سویه های آنروتوکسین زای استافیلوکوکوس آرنوس می توانند یک یا چندین نوع از توکسین هایی را که از نظر سرولوژیکی متفاوت هستند هم زمان تولید کنند. اخیراً ژن های بیشتری از SE (U, K-R) علاوه بر ژن هایی که قبلاً گزارش شده بود (A-J) تشخیص داده شده است ولی نقش آنها در مسمومیت های غذایی مشخص نیست (Letertre et al., 2003). بیش از ۹۵٪ از آنروتوکسین های این باکتری که ایجاد مسمومیت های غذایی می کنند جزء گروه A-E هستند (Cremonesi et al., 2005).

برای تشخیص توکسین بهترین وسیله = روش سرولوژیکی است ولی خالص سازی توکسین جدا شده از غذا هنوز مشکل عمده این نوع آزمایشات می باشد (رضویلر، ۱۳۸۱). با این وجود روش های مولکولی برای تشخیص ژن های مولد سموم SE نیز بطور گسترده ای توسعه یافته اند. روش های مولکولی از جمله مولتی پلکس PCR در مقایسه با آزمایشات ایمونولوژیکی تولید توکسین، سریع تر، اختصاصی تر، حساس تر و قابل اطمینان تر است (Pinto et al., 2005).

شده است. کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ۰/۵ میکرومولار و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) مخلوط واکنش را تشکیل می‌دادند. واکنش زنجیره پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت مورد عکس برداری قرار گرفتند. برای نشان دادن اندازه قطعات تکثیری از bp Ladder ۱۰۰ استفاده شد.

به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در ویال و برداشت لایه رویی و انتقال آن به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال‌ها را برداشته و هم حجم آنها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰°C- قرار داده شده و با سانتریفیوژ با شدت ۱۲۰۰۰×g DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرو لیتر آب دیونیزه حل گردید (Atashpaz et al., 2010).

### انجام مولتی پلکس PCR برای ژن‌های آنروتوکسین

این واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای انتخاب شده برای باکتری‌ها انجام گرفت که پرایمرها و توالی اختصاصی آنها در جدول (۱) آورده

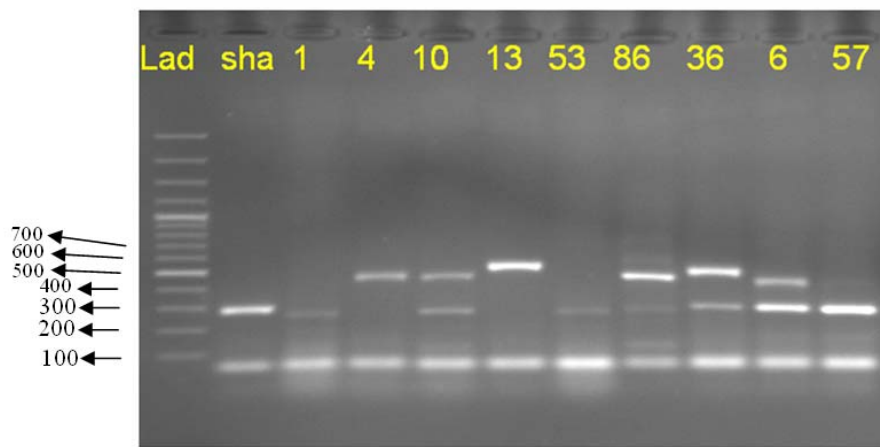
جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR جهت تشخیص ۶ ژن آنروتوکسین

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه باند (جفت باز)	منبع
Sea	SEA-F	GCA GGG AAC	۵۲۱	Monday and Bohach, 1999
	SEA-R	AGC TTT AGG C		
Seb	SEB-F	GTT CTG TAG	۶۶۷	Lovseth et al., 2004
	SEB-R	AAG TAT GAA ACA CG		
Seg	SEG-1	ACA TGT AAT TTT	۲۸۷	Rall et al., 2008
	SEG-2	GAT ATT CGC ACT G		
Seh	SHE-F	TGC AGG CAT	۳۶۰	Monday and Bohach, 1999
	SHE-R	CAT GTC ATA CCA		
Sei	SEI-1	AAG TAG ACA	۴۵۴	Rall et al., 2008
	SEI-2	TTT TTG GCG TTC C		
Sej	SEJ-1	AGA ACC ATC	۱۴۲	Monday and Bohach, 1999
	SEJ-2	AAA CTC GTA TAG C		

**یافته‌ها**

نتایج مربوط به مولتی پلکس PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. فراوانی ژن‌های مولد آنترتوکسین و فراوانی باهم بودن این ژن‌ها در یک سویه در جدول ۲ نشان داده شده است. در بین ژن‌های آنترتوکسین مورد آزمایش، ژن *Seg* بیشترین فراوانی (۸ سویه) و ژن *Seb*

کمترین فراوانی (منفی) را داشت. تنها در ۹ مورد (۴۰/۹٪) از نمونه‌ها، ژن‌های آنترتوکسین مورد آزمایش مشاهده شد. چهار مورد (۱۸/۱۸٪) دارای بیش از یک نوع ژن آنترتوکسین بودند که ژن *Seg* در تمام آنها مشترک بود.



شکل ۱- الکتروفورز محصول مولتی پلکس PCR در آگارز ۱/۵ درصد. به ترتیب از سمت چپ به راست شامل: *Sha: S.aureus* PTCC 1112، محل‌های تشکیل باند: *Sha*: ۲۸۷bp، شماره ۱: ۲۸۷ bp، شماره ۴: ۴۵۴ bp، شماره ۱۰: ۲۸۷ bp و ۴۵۴ bp، شماره ۱۳: ۵۲۱ bp، شماره ۵۳: ۲۸۷ bp، شماره ۸۶: ۲۸۷ bp و ۴۵۴ bp و ۱۴۲ bp، شماره ۳۶: ۲۸۷ bp و ۵۲۱ bp، شماره ۶: ۲۸۷ bp و ۳۶۰ bp، شماره ۵۷: ۲۸۷ bp

جدول ۲- فراوانی ژن‌های مولد آنترتوکسین و فراوانی باهم بودن این ژن‌ها در یک سویه

ژن	تعداد سویه‌ها	ترکیب ژن‌ها	تعداد سویه‌ها
Sea	۲	Sea+Seg	۱
Seb	-	Seg+Seh	۱
Seg	۸	Seg+Sei	۱
Seh	۱	Seg+Sei+Sej	۱
Sei	۳		
Sej	۱		
جمع	۲۲		

## بحث و نتیجه گیری

مطالعه بر روی مسمومیت‌های غذایی با منشاء استافیلوکوکوس آرتوس به قرن ۱۹ باز می‌گردد (Abbar, 2010)، زمانی که به نظر می‌رسید شیر و فرآورده‌های آن اهمیت زیادی در خصوص چنین مسمومیت‌هایی دارند. اعتقاد بر این است که میزان آلودگی فرآورده‌های شیر بدلیل آلودگی‌هایی است که در طی فرآیند تولید آنها اتفاق می‌افتد. تحقیقات دقیق نشان داده که منابع آلودگی پنیر شامل شیرخام، شیر با پاستوریزاسیون ناقص و یا آلودگی مجدد شیر پاستوریزه با میکروب‌های ناشی از شیرخام یا از محیطی که در آن پنیرسازی انجام می‌شود می‌باشد (Little et al., 2008). در بین بسیاری از توکسین‌های خارج سلولی استافیلوکوکوس آرتوس، انتروتوکسین‌ها بیشترین خطر را ایجاد می‌کنند (Akineden et al., 2008). طبق گزارشات محققین، بیشترین فراوانی ژن انتروتوکسین مربوط به ژن *Sea* می‌باشد (Gilmour and Harvey, 1990). در مطالعه‌ای که بر روی ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکوس آرتوس از محصولات لبنی سنتی صورت گرفت ۳۱/۱٪ کل سویه‌های جدا شده از مواد لبنی، یکی از دو ژن *Sea* و *Seb* یا هر دو را دارا بود که درصد سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس دارای ژن‌های *Sea*، *Seb* و *Sea+Seb* به ترتیب ۱۵/۶، ۹/۳ و ۶/۲ درصد بودند (Imani Fooladi et al., 2010). نتایج مشابهی در ارتباط با غالب بودن ژن *Sea* در بین سویه‌های با منشاء انسانی گزارش گردیده است (Haveri et al., 2007). در این تحقیق بیشترین فراوانی ژن انتروتوکسین مربوط به ژن *Seg* بود که با نتایج تحقیقات سائر و همکاران مطابقت دارد (Sauer et al.,

2008). در تحقیقی بر روی میزان فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین استافیلوکوکوی از نمونه‌های شیر، بیشترین فراوانی مربوط به ژن *Seg* گزارش شد (Ahmadi and Dastmalchi Saei, 2013). در مطالعه‌ای مشخص شده است که انتروتوکسین‌های *G*، *I* و *J* بیش از سایر انواع انتروتوکسین در بین سویه‌های استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از موارد التهاب پستان گاو شایع می‌باشند (Akineden et al., 2001). در تحقیقی دیگر که بر روی میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسین‌های معمول در استافیلوکوکوس آرتوس‌های جدا شده از شیر گاومیش صورت گرفته بود، بیشترین میزان شیوع، مربوط به ژن *Seg* گزارش شد و ژن *Sea* در هیچ‌کدام از سویه‌ها شناسایی نشد (اثنی عشری و همکاران، ۱۳۹۱). انتروتوکسین *Seg* بیشتر با منشاء دامی می‌باشد و نشان‌دهنده آلودگی نمونه‌های پنیر با شیر خام آلوده با منشاء دامی است که این امر به کم بودن میزان دستکاری انسانی در خصوص شیر خام صحنه می‌گذارد. در اکثر مطالعات پیشین، موارد مثبت آلودگی‌های محصولات لبنی به استافیلوکوکوس آرتوس حاوی ژن انتروتوکسین با منشاء انسانی گزارش شده بود ولی در تحقیق اخیر، اکثر آلودگی با منشاء دامی بوده و دستکاری انسانی در آن دخیل نیست که این امر با نتایج مطالعات اثنی عشری و همکاران (۱۳۹۱) و احمدی و دستمالچی ساعی (۲۰۱۳) مطابقت دارد. 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). نتایج مطالعات بدست آمده در این تحقیق در مقایسه با سایر مطالعات، نشان‌دهنده

جغرافیایی و نیز اختلاف در منشاء اکولوژیکی سویه های جدا شده (شیر، انسان و دام های مختلف) ناشی می شود.

اختلاف در پراکندگی ژن های موثر در تولید انواع آنتروتوکسین در بین سویه های مختلف استافیلوکوکوس آرتوس می باشد که این امر احتمالاً از تفاوت های

## منابع

- اثنی عشیری، مهرداد؛ شایق، جلال و نصرالهی عمران، آیت اله (۱۳۹۱). مطالعه میزان شیوع ژن های آنتروتوکسین های معمول در استافیلوکوکوس آرتوس های جدا شده از شیر گاو میش های شهرستان تبریز به روش Multiplex PCR. مجله بهداشت مواد غذایی، سال دوم، شماره ۲، صفحات: ۶۸-۶۱.
- رضویلر، ودود (۱۳۸۱). میکروب های بیماری زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت های غذایی. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۱۲۹-۱۲۸.
- ملک زاده، فریدون (۱۳۸۱). میکروب شناسی. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه: ۶۵.
- 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 Veterinary Journal, 9(3): 27-35.
- Akineden, O., Ahmed Hassan, A., Schneider, E. and Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 124: 211-216.
- 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.
- Atashpaz, S., Khani, S., Barzegari, A., Barar, J., Vahed, S.Z., Azarbaijani, R., et al. (2010). A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. Mikrobiologija, 79(4): 562-566.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., et al. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes, 19: 299-305.
- Gilmour, A. and Harvey, J. (1990). Staphylococci in milk and milk products. Journal of Applied Microbiology, 147s-166s.
- 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.
- Imani Fooladi, A.A., Tavakoli, H.R. and Naderi, A. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 2(3): 137-142.
- Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. and Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Microbiology, 95: 38-43.
- Little, C.L., Rhoades, J.R., Sago, S.K., Harris, j., Greenwood, M., Mithani, V., et al. (2008). Microbiological quality of retail chesse made form raw thermizd or pasterurizd milk in the UK. Food Microbiology, 25: 304-312.

- 
- Lovseth, A., Loncarevic, S. and Berdal, K.G. (2004). Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in Staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 3869-3872.
  - Monday, S.R. and Bohach, G.A. (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10): 3411-3414.
  - Pinto, B., Chenoll, E. and Aznar, R. (2005). Identification and typing of foodborne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 340-352.
  - Rall, V.L., Vieira, F.P., Rall, R., Vieitis, R.L., Fernandes, A.Jr., 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): 408-13.
  - Sauer, P., Sila, J., Stosova, T., Vecerova, R., Hejnar, P., Vagnerova, I., *et al.* (2008). Prevalence of genes encoding extracellular virulence factors among meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the University Hospital, Olomouc, Czech Republic. *Journal of Medical Microbiology*, 57:403-410.

## **Prevalence of six genes encoding enterotoxins production of *Staphylococcus aureus* isolated from white-brined-cheese by multiplex PCR**

**Mahdavi, S.**

1- Assistant Professor of Microbiology Department, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

\*Corresponding author email: S.mahdavi@iauh-maragheh.ac.ir

(Received: 2013/12/5 Accepted: 2014/6/18)

### **Abstract**

Isolation, identification and grouping of Staphylococcal enterotoxins in milk is of great importance since these toxins are considered as a major potential source of human illness. In this study, 22 coagulase positive strains of *Staphylococcus aureus* isolated from white brine cheese produced in rural areas of Maragheh, were assessed for the existence of six genes encoding enterotoxin synthesis using multiplex PCR. For this, extracted DNA was subjected to multiplex PCR for the presence of enterotoxin a, b, g, h, i and j genes. Amongst seg was the most frequent (8 strains) gene; meanwhile seb gene was not detected in any of the isolates. According to the results, 9 strains (40.9%) harbored the genes encoding enterotoxin production. Four strains (18.18%) contained more than one enterotoxin gene. The results of this study indicated that most of *Staphylococcus aureus* isolates in traditional cheeses have the potency to produce enterotoxin.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, Cheese, Multiplex PCR