

## تعیین انتروتوکسین‌های کلاسیک/استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ناگت مرغ و غذاهای آماده مصرف در استان اصفهان به روش ELISA

هاجر مداحی<sup>۱</sup>، فاطمه رستمی<sup>۱</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۲\*</sup>، فرهاد صفر پور دهکردی<sup>۳</sup>، محمد جلالی<sup>۴</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده کشاورزی، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته مهندسی علوم و صنایع غذایی، شهرکرد، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده کشاورزی، دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، شهرکرد، ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، شهرکرد، ایران.

۴- دانشیار گروه بهداشت و ایمنی غذا، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۲/۷/۲۷ پذیرش نهایی: ۹۳/۴/۲)

### چکیده

این مطالعه با هدف تعیین انتروتوکسین‌های کلاسیک/استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از ناگت مرغ و غذاهای آماده مصرف در استان اصفهان به روش ELISA انجام شده است. در تابستان ۱۳۹۱ در مجموع ۴۲۰ نمونه انواع ناگت مرغ از مراکز فروش استان اصفهان به طور تصادفی جمع‌آوری و از تمامی نمونه‌ها به منظور بررسی وجود استافیلوکوکوس اورئوس کشت میکروبی تهیه شد. به منظور تشخیص انتروتوکسین‌های کلاسیک، سویه‌های جدا شده استافیلوکوکوس اورئوس به روش ELISA مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه قدرت تولید انتروتوکسین‌های کلاسیک در ۲۰ سویه از ۲۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌ها (۸۳/۳ درصد) تعیین شد که شایع‌ترین انتروتوکسین ردیابی شده در سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین A (۴۰ درصد)، پس از آن انتروتوکسین‌های C (۱۵ درصد) و D (۱۰ درصد) بود. همچنین سه سوش قادر به تولید هر دو انتروتوکسین A و D و سه سوش قادر به تولید انتروتوکسین A و C بودند و قابلیت تولید انتروتوکسین E در هیچ کدام از سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌ها مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ناگت مرغ و غذاهای آماده مصرف می‌توانند به عنوان یکی از منابع مسمومیت غذایی استافیلوکوکی باشند و مطالعات بیشتر در زمینه وضعیت آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در سایر مواد غذایی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین، ناگت مرغ، ELISA

## مقدمه

به شمار می‌رود (Kluytmans and Wertheim, 2005). در ایالات متحده بین سال‌های ۱۹۸۳ تا ۱۹۸۷ استافیلوکوکوس اورئوس ۷/۸٪ (۴۷ مورد) از ۶۰۰ مورد شیوع مسمومیت‌های غذایی باکتریایی را تشکیل می‌داد. در انگلستان و ولز در طی همان دوره زمانی مسمومیت غذایی استافیلوکوکی ۱/۹٪ (۵۴ مورد) از کل ۲۸۱۵ مورد شیوع مسمومیت را در بر می‌گرفت (Fueyo et al., 2004; Martin et al., 2005). گزارشات زیادی از ارزیابی میکروبی انواع غذاهای آماده مصرف و آلودگی آن‌ها به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و انتروتوکسین تولید شده از آن در نقاط مختلف جهان وجود دارد که از آن جمله می‌توان به مطالعات نورمانو (2005-2007)، اوه (2007) و لین (2009) اشاره کرد. استافیلوکوکوس اورئوس اغلب در شیر خام ورم پستانی و فرآورده‌های لبنی مختلف مانند پنیر و همچنین در فرآورده‌های گوشتی یافت می‌شود. لذا این فرآورده‌ها به عنوان منابع مهم توکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس شناخته شده‌اند. از طرف دیگر به دلیل تحمل بالای استافیلوکوکوس اورئوس به aw پایین و نمک و قدرت رشد در دامنه وسیعی از دما و pH از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای مولد مسمومیت به شمار می‌رود (Normanno and Lasalandra, 2007). بنابراین به دلیل اهمیت این توکسین‌ها در سلامت عمومی مطالعات فراوانی در خصوص تعیین شیوع سوش‌های توکسین‌زا و بررسی حضور توکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی در تمام نقاط مختلف دنیا انجام شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی A, B, C, D در استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ناگت مرغ و

امروزه غذاهای آماده مصرف حتی در کشورهای در حال توسعه به دلیل تنوع غذایی در کنار سهولت مصرف و عدم نیاز به پخت طرفداران زیادی پیدا کرده و مصرف آن رو به افزایش است. با این وجود، گزارش‌های فراوانی از آلودگی این غذاها به استافیلوکوکوس اورئوس مولد انتروتوکسین از نقاط مختلف دنیا حتی کشورهای توسعه یافته همچون آمریکا و ژاپن و به‌ویژه کشورهای جنوب‌شرقی آسیا (تایوان، تایلند، کره جنوبی) وجود دارد (Chomvarin et al., 2004; Reji and Antrekker, 2006). جنس استافیلوکوکوس متعلق به خانواده میکروکوکاسه بوده که مهم‌ترین گونه این جنس استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. استافیلوکوکوس اورئوس عامل اصلی مسمومیت غذایی استافیلوکوکی و عفونت‌های خارج روده‌ای مانند زخم، دمل، ذات‌الریه، مننژیت و غیره است (Redmond and Griffith, 2003). تاکنون ۱۸ انتروتوکسین تولیدی از استافیلوکوکوس اورئوس گزارش شده که انتروتوکسین‌های کلاسیک A, B, C و D مهم‌ترین عامل شیوع مسمومیت به شمار می‌روند. از نظر مقاومت به شرایط فیزیکی و شیمیایی تقریباً تمام سروتیپ‌های انتروتوکسین به جز انتروتوکسین B و C در مقابل حرارت و عوامل آنزیمی از جمله تریپسین موجود در دستگاه گوارش مقاوم‌اند (Paciorek et al., 2007). انتروتوکسین‌های A و B به عنوان عوامل اصلی گاستروانتریت شناخته شده‌اند. SEA در برخی از مناطق عامل بیش از ۵۰ درصد مسمومیت‌های غذایی بوده، همچنین در بریتانیا و ایالات متحده آمریکا SEA و SEB عامل بیش از ۶۹ درصد کل مسمومیت‌های غذایی

## شناسایی انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس اورئوس

به منظور تشخیص و شناسایی انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس اورئوس، جدایه‌ها به مدت یک شب در ۱۰ میلی‌لیتر محیط آبگوشت مغزی (Merk Germany) در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. به منظور شناسایی انتروتوکسین‌های SEA, SEB, SEC, SED, SEE از روش الیزا استفاده گردید. مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و حداکثر در دمای ۱۰ درجه سلسیوس و با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس لایه چربی سطح نمونه‌ها برداشته شد. فاز آبی به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر سترون رقیق و با کمک فیلترهای سرنگی فیلتر شدند.

کیت الیزای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت RIDASCREEN® SET (A, B, R-Biopharm آلمان, C, D, E Art.No:R4101, R-Biopharm AG, Germany) تهیه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد و نمونه‌های آماده‌سازی شده به کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتری به حفره‌های میکروپلیت اضافه و سپس به مدت ۱ ساعت به دور از نور و در درجه حرارت ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس مایع موجود در میکروپلیت خارج شده و با ضربه زدن ملایم به میکروپلیت و قراردادن آن به شکل وارونه بر روی کاغذهای جاذب‌الرطوبه مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد، سپس همه حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، شسته شد (عمل شستشو دوبار تکرار گردید) و هر بار بعد از تخلیه مایع شستشو میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه

غذاهای آماده مصرف در استان اصفهان طراحی و انجام شده است.

## مواد روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌ها

در تابستان ۱۳۹۱ در مجموع ۴۲۰ نمونه انواع ناگت مرغ تولیدی در ۹ شرکت مختلف به طور تصادفی از مراکز فروش در استان اصفهان جمع‌آوری و در اسرع وقت در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد و حداکثر ۲۴ ساعت پس از نمونه‌گیری از نظر حضور استافیلوکوکوس اورئوس و انتروتوکسین‌های کلاسیک این باکتری مورد آزمایش قرار گرفتند.

### جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه به ۹۰ گرم از محلول استریل بافر فسفات نمکی اضافه شد و سپس به مدت چند دقیقه گردید تا به صورت همگن درآید. جهت شمارش کلنی‌های استافیلوکوکوس اورئوس از محیط برد پارکر آگار (Difco, USA) مطابق با دستورالعمل لین و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد. رقت‌هایی از محلول سوسپانسیون حاوی نمونه‌ها را بر روی سطح پلیت برد پارکر آگار کشت سطحی داده و پس از ۴۸-۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، در نهایت کلنی‌ها از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند و جهت تأیید شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس تست‌های گرم، کاتالاز، کوآگولاز، تخمیر مانیتول و آزمون وگس پروسکاور (Vp) بر روی پرگنه‌های مشکوک انجام گرفت (Kiedrowski et al., 2011).

دستمال کاغذی قرار می‌گرفت تا کاملاً باقی‌مانده آب شستشو خارج شود به این ترتیب موادی که بعد از این مدت در واکنش شرکت نکرده‌اند خارج شدند. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه شده با آنزیم به حفره‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت دیگر در گرم‌خانه ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از این زمان، مایع موجود در حفره‌ها به طور کامل تخلیه شد. سپس همه حفره‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر مخصوص شستشو، شسته شد. عمل شستشو دوبار تکرار گردید و هر بار بعد از تخلیه مایع شستشو میکروپلیت به طور وارونه بر روی چند لایه دستمال کاغذی قرار می‌گرفت تا کاملاً باقی‌مانده آن خارج شود. سپس ۵۰ میکرولیتر سوبسترا و ۵۰ میکرولیتر کروموژن به هر حفره اضافه شد و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس در تاریکی گرم-خانه‌گذاری شد. در نهایت برای توقف واکنش، محلول قطع واکنش به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها اضافه شد و میزان جذب هر نمونه با قرائت‌کننده الایزا (Stat Fax 2100, England) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت و اطلاعات مربوط به میزان جذب (OD) هر حفره به تفکیک ثبت شد. به منظور کنترل کیفیت آزمون بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت میزان جذب (OD) کنترل مثبت باید برابر یا بیشتر از ۰/۵ واحد و

میانگین میزان جذب (OD) برای کنترل منفی باید مساوی یا کمتر از ۰/۳ باشد.

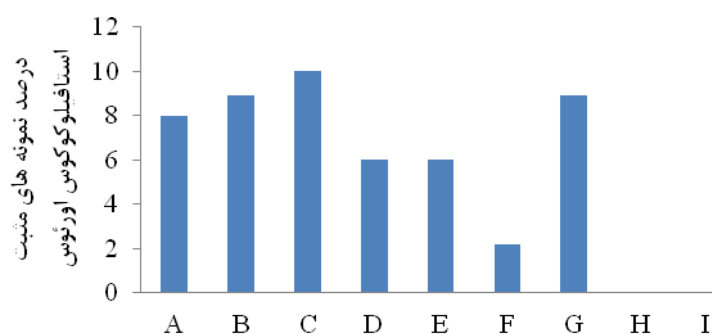
بعد از انتقال یافته‌های بدست آمده به نرم افزار Excel، این اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS/18، آزمون‌های ضریب همبستگی و مربع کای در سطح ( $p < 0/05$ ) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

### یافته‌ها

جدول (۱) وضعیت آلودگی نمونه‌های ناگت مرغ را به استافیلوکوکوس اورئوس نشان می‌دهد. از مجموع ۴۲۰ نمونه ناگت مرغ ۲۴ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بودند. بیشترین آلودگی در نمونه‌های شرکت C به میزان ۱۰ درصد و کم‌ترین آلودگی در نمونه‌های شرکت F به میزان ۲/۲ درصد مشاهده شد. در حالی که هیچ یک از ۴۵ نمونه شرکت H و ۴۰ نمونه شرکت I مورد مطالعه از نظر آلودگی به این پاتوژن مثبت نبودند (نمودار ۱). با توجه به مقادیر به دست آمده اختلاف آماری معنی‌داری بین میزان شیوع آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در بین نمونه‌های مختلف ناگت مرغ وجود ندارد ( $p < 0/05$ ).

جدول ۱- میزان و درصد فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس های مولد انتروتوکسین های کلاسیک در نمونه های ناگت مرغ در استان اصفهان

نمونه	تعداد	فراوانی استافیلوکوکوس اورئوس	SEs (%)						استافیلوکوکوس اورئوس مولد SEs	
			SEA + SED	SEA + SEC	SEE	SED	SEC	SEB		SEA
A	۵۰	۴ (٪۸)	-	-	-	-	۱	-	۳	۴ (٪۱۰۰)
B	۴۵	۴ (٪۸/۹)	۲	-	-	-	-	-	۱	۳ (٪۷۵)
C	۵۰	۵ (٪۱۰)	-	۱	-	-	۱	۱	۱	۳ (٪۶۰)
D	۵۰	۳ (٪۶)	-	-	-	۱	۲	-	-	۳ (٪۱۰۰)
E	۵۰	۳ (٪۶)	-	-	-	-	-	-	۲	۲ (٪۶۶/۷)
F	۴۵	۱ (٪۲/۲)	-	-	-	-	-	-	۱	۱ (٪۱۰۰)
G	۴۵	۴ (٪۸/۹)	۱	۲	-	-	-	-	-	۴ (٪۱۰۰)
H	۴۵	۰ (٪۰)	-	-	-	-	-	-	-	۰ (٪۰)
I	۴۰	۰ (٪۰)	-	-	-	-	-	-	-	۰ (٪۰)
مجموع	۴۲۰	۲۴ (٪۵/۷)	۳	۳	-	۲	۳	۱	۸	۲۰ (٪۸۳/۳)

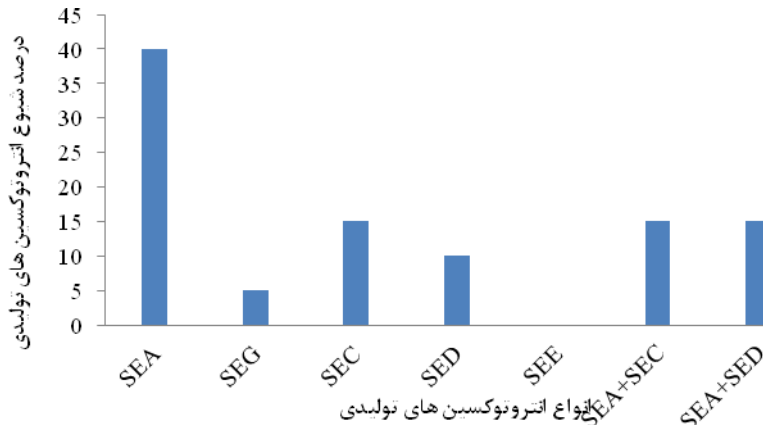


ناگت مرغ (Brand A-I)

نمودار ۱- آلودگی برندهای مختلف ناگت مرغ به استافیلوکوکوس اورئوس

درصد) بوده است. همچنین سه سوش (۱۵ درصد) قادر به تولید هر دو انتروتوکسین A و D و سه سوش (۱۵ درصد) قادر به تولید انتروتوکسین A و C بودند. قابلیت تولید انتروتوکسین E در هیچ کدام از سوش های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه ها مشاهده نشد (نمودار ۲).

از بین ۲۴ سوش استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه های ناگت مرغ ۲۰ سوش (۸۳/۳ درصد) قادر به تولید انتروتوکسین های کلاسیک (A-E) بودند (جدول ۱). شایع ترین انتروتوکسین کلاسیک تولید شده از بین سوش های مورد مطالعه انتروتوکسین A (۴۰ درصد) و پس از آن انتروتوکسین های C (۱۵ درصد) و D (۱۰



نمودار ۲- درصد شیوع انتروتوکسین‌های تولیدی در ناگت مرغ (Brand A-1)

استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های ناگت مرغ ۵/۷ درصد تعیین شد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج بسیاری از پژوهشگران دیگر هم‌خوانی دارد (Lin *et al.*, 2009; Soriano *et al.*, 2002). آیسچیچک و همکاران میزان آلودگی غذاهای آماده مصرف به استافیلوکوکوس اورئوس را ۹/۴ درصد و او و همکاران این میزان را ۸/۶ درصد گزارش کردند که این نتایج با یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر تقریباً مشابه است (Aycicek *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2007). نتایج بررسی حاضر درصد پائینی از آلودگی استافیلوکوکوس اورئوس در ناگت مرغ را نشان داده (۵/۷ درصد) که این نتایج با برخی از نتایج پیشین اختلاف معنی‌داری دارد (Known *et al.*, 2006; McMahon, 2003). طی مطالعه‌ای که بر روی سه گروه از مواد غذایی عرضه شده به بازار انجام گرفت میزان آلودگی غذاهای گوشتی آماده مصرف بیش‌تر از دو محصول

## بحث و نتیجه‌گیری

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل فرصت طلب بیماری‌زا می‌باشد که در شرایط مساعد قادر است در انسان و حیوانات ایجاد عفونت کند. این باکتری علاوه بر آن می‌تواند موجب مسمومیت غذایی در افراد نیز شود. مسمومیت استافیلوکوکی مسمومیتی با منشا غذایی است که در اثر انتروتوکسین تولید شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می‌گردد و اغلب مربوط به غذاهای آماده مصرفی است که پس از فرآیند آلوده شده‌اند از جمله انواع سالادها و ساندویچ‌ها که این مسئله خطر بالقوه‌ای را برای سلامت جامعه به همراه دارد (Normanno and Lasalandra, 2007). به همین دلیل پژوهش‌های فراوانی در خصوص تعیین شیوع سوش‌های توکسین‌زا و بررسی حضور توکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در مواد غذایی در اغلب کشورها انجام شده است که نتایج به دست آمده نشان‌دهنده آلودگی ۱۰۰-۰ درصدی مواد غذایی به

انتروتوکسین E در هیچ کدام از سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌ها مشاهده نشد. نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استافیلوکوکوس اورئوس موجود در ناگت مرغ از نظر تولید انتروتوکسین SEA-SED فعال بوده که این نتایج با نتایج پیشین مطابقت دارد (Lim et al., 2004; Omoe and Ishikawa, 2002). آیدین و همکاران قدرت تولید انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از مواد غذایی را ۷۲/۱ درصد بیان کردند که به ترتیب انتروتوکسین A، B و C شایع‌ترین انتروتوکسین‌های ردیابی شده گزارش شدند و این میزان شیوع انتروتوکسین با داده‌های حاضر هم‌خوانی دارد (Aydin and Sudagidan, 2011). در صورتی که در کره احتمال آلودگی به انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت خام ۷/۸ درصد عنوان شد که اختلاف معنی‌داری ( $P \leq 0.05$ ) را با مطالعه حاضر نشان می‌دهد و علت آن را می‌توان به عدم رقابت استافیلوکوکوس اورئوس با فلور میکروبی گوشت خام دانست (Moon et al., 2007). گزارش بستان حاکی از آن است که به ترتیب ۴۵/۴ درصد، ۱۰/۹ درصد و ۲۱ درصد از سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس قادر به تولید انتروتوکسین‌های A، B و C بوده‌اند که همانند مطالعه حاضر بالاترین میزان استافیلوکوکوس اورئوس مولد انتروتوکسین مربوط به سوش‌های مولد انتروتوکسین A بوده است (Bostan and Cetin, 2006). طی پژوهشی به منظور بررسی عوامل مسمومیت غذایی در تایوان نشان داده شد که از بین انتروتوکسین‌های عامل مسمومیت انواع A، B و C به ترتیب با پراکندگی ۲۹/۲ درصد، ۱۹/۷ درصد و ۶/۷

دیگر و در حدود ۳۶ درصد گزارش شد (Moon et al., 2007). تاکنون در ایران نیز مطالعاتی در این راستا صورت گرفته است (Eshraghi and Salehipur, 2009; Tavakoli and Riazipour, 2008). در پژوهشی که توسط اشراقی و همکاران در شهرستان تهران بر روی ۴۵۸ نمونه از فرآورده‌های گوشتی خام و پخته انجام شد میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس ۳/۵ درصد گزارش گردید (Eshraghi and Salehipur, 2009). توکلی و ریاضی‌پور نمونه‌های غذایی ۶ مرکز بهداشتی درمانی در تهران را از نظر میکروبیولوژیک مورد بررسی قرار دادند و آلودگی ۵۵/۶ درصد به استافیلوکوکوس اورئوس مورد تایید قرار گرفت که بیش از نتایج بررسی ما بود (Tavakoli and Riazipour, 2008). همچنین طی مطالعه‌ای در ایران بر روی گوشت طیور نشان داده شد که ۶۵ درصد نمونه‌های گوشت طیور از نظر حضور استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بودند (Javadi and Safarmashaei, 2011). در صورتی که نتایج حاصل از پژوهش فیضی و همکاران این مقدار را ۸۱/۷۵ درصد گزارش کردند (Feizi et al., 2012).

در این مطالعه ۲۰ سویه از ۲۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های ناگت مرغ (۸۳/۳ درصد) قدرت تولید انتروتوکسین‌های کلاسیک را داشتند که شایع‌ترین انتروتوکسین ردیابی شده در سوش‌های استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسین A (۴۰ درصد)، پس از آن انتروتوکسین‌های C (۱۵ درصد) و D (۱۰ درصد) بود. همچنین سه سوش قادر به تولید هر دو انتروتوکسین A و D و سه سوش قادر به تولید انتروتوکسین A و C بودند و قابلیت تولید

سنگاپور گزارش کردند که این داده با داده‌های حاصل از مطالعه حاضر (SEA) هم‌خوانی ندارد (Ng and Tay, 1993). در ایران نیز با بررسی ۹۱۳ نمونه غذایی، شایع‌ترین انتروتوکسین تولیدی در فرآورده‌های لبنی، انتروتوکسین D (۲۰٪) و C (۱۶٪) و در فرآورده‌های گوشتی، انتروتوکسین D (۶٪) و E (۳٪) عنوان شد (Soltan Dallal et al., 2010).

بازرسی نادرست گوشت طیور، نگهداری گوشت در شرایط نامناسب محیطی، عدم رعایت شرایط بهداشتی در کشتارگاه‌ها و در حین فرآیند تولید می‌تواند از دلایل اصلی شیوع استافیلوکوکوس/اورئوس در گوشت و فرآورده‌های آن از جمله نمونه‌های ناگت طیور باشد. همچنین آلودگی بالای ماده اولیه یا حرارت‌دهی ناقص به بقای این پاتوژن در فرآورده کمک می‌کند. از طرفی احتمال آلودگی نمونه‌ها پس فرآیند تولید در حین بسته‌بندی و آسیب‌دیدگی بسته نیز وجود دارد. لذا با آموزش افراد در زمینه کنترل مسائل بهداشتی و اجرای سیستم‌های GMPs, GAPs و HACCP در تمام مراحل تولید، انتقال، نگهداری و فروش می‌توان شیوع مسمومیت استافیلوکوکوی را به حداقل رساند.

### سپاسگزاری

نویسندگان از کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مرکز کنترل کیفی بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، کمال تشکر و قدردانی را دارد.

درصد نقش مؤثر داشتند (Chiang et al., 2008). در مطالعه انجام شده توسط نورمانو و همکاران بر روی ۵۳۶۹ نمونه غذای آماده مصرف در ایتالیا ۴۵/۲ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس جدا شده، حاوی ژن‌های تولید کننده انتروتوکسین بودند که در این میان سویه‌های جدا شده تولیدی شامل SEA (۳۰/۳ درصد)، SEB (۷/۶ درصد)، SEC (۵۱/۵ درصد)، SED (۶/۱ درصد) و SEA+SEB (۱/۵ درصد) و SEA+SED (۳ درصد) گزارش گردید (Normanno et al., 2005). در مطالعه دیگری بیش‌ترین انتروتوکسین جدا شده از سویه‌های استافیلوکوکوی در کل نمونه‌های گوشت و شیر SED با مقدار ۳۳/۶ درصد بود. شیوع SEA، SEC و SEB موجود در این نمونه‌ها به ترتیب ۱۸/۴، ۱۵/۲ و ۶/۴ درصد گزارش شد در صورتی که در نمونه‌های ناگت مرغ بیش‌ترین انتروتوکسین جدا شده استافیلوکوکوی SEA با مقدار ۴۰ درصد و پس از آن به ترتیب SEC (۱۵ درصد) و SED (۱۰ درصد) گزارش گردید (Normanno and Lasalandra, 2007). مطالعات نشان داده شایع‌ترین انتروتوکسین استافیلوکوکوس/اورئوس عامل مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکوی انتروتوکسین A و به دنبال آن انتروتوکسین D می‌باشد (Normanno et al., 2005). اگرچه انتروتوکسین C نیز به عنوان یکی از مهم‌ترین انتروتوکسین‌های عامل مسمومیت غذایی معرفی شده است (Normanno and Lasalandra, 2007). طی مطالعه‌ای SEB را به عنوان شایع‌ترین انتروتوکسین در غذاهای آماده مصرف و نوبابه‌ها در کشورهای جنوب شرقی آسیا مانند مالزی و



## منابع

- اشراقی، سعید؛ صالحی پور، زهره؛ پورمند، محمدرضا؛ رحیمی فروشانی، عباس؛ زهرایی صالحی، محمدتقی؛ آقا امیری، سولماز؛ بختیاری، روناک و همکاران (۱۳۹۲). بررسی توزیع فراوانی ژنهای *tst* با ژنهای *entC*، *entA* و *entA/C* در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از مواد غذایی مختلف. مجله علوم پزشکی تهران، دوره ۶۷، شماره ۷، صفحات: ۴۷۰-۴۷۶.
- Aycicek, H., Cakiroglu, S. and Stevenson, T.H. (2005). Incidence of *S.aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. Food Control, 16: 531-534.
- Aydin, A. and Sudagidan, M. (2011). Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. International Journal of Food Microbiology, 148: 99- 106.
- Bostan, K. and Cetin, O. (2006). The presence of *Staphylococcus aureus* and taphylococcal enterotoxins in ready-to-cook meatballs and white pickled cheese. Journal of Faculty Veterinary Medical Istanbul University, 32: 31-39.
- Chiang, Y.C., Liao, W.W., Fan, C.M., Pai, W.Y., Chiou, C.S. and Tsen, H.Y. (2008). PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. International Journal of Food Microbiology, 15: 66-73.
- Chomvarin, C., Chantarasuk, Y., Srigulbutr, S., Chareonsudjai, S. and Haicumpar, K. (2006). Enteropathogenic bacteria and enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from ready-to-eat foods in Khon Kaen, Thailand. Southeast Asian Journal of Tropic Medical Public Health, 37: 983-990.
- Feizi, A., Nazeri, M. and Pilevar, A. (2012). Isolation of *Staphylococcus* spp. genera from broiler breeder flocks in East Azerbaijan Province of Iran: Prevalence and antimicrobial susceptibility. African Journal of Microbiology Research, 6: 5819-5823.
- Fueyo, J.M., Mendoza, M.C. and Martin, M.C. (2005). Enterotoxins and toxic shock syndrometoxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. Microbes and Infection, 7: 187-194.
- Javadi, A. and Safarmashaei, S. (2011). Microbial profile of marketed broiler meat. Middle East Journal of Science Research, 9: 652-656.
- Kiedrowski, M.R., Kavanaugh, J.S., Malone, C.L., Mootz, J.M., Voyich, J.M., Smeltzer, M.S., Bayles, K.W. and Horswil, A.R. (2011). Nuclease Modulates Biofilm Formation in Community Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Plose One, 6(11): 1-16.
- Kluytmans, J.A. and Wertheim, H.F. (2005). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections, 33(1): 3-8.
- Kwon, N.H., Park, K.T., Jung, W.K., Youn, H.Y., Lee, Y., Kim, S.H., et al. (2006). Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. Veterinary Microbiology, 117: 304-312.
- Lim, S., Joo, Y., Moon, J., Lee, A., Nam, H., Wee, S., et al. (2004). Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. Journal of Veterinary Medical Science, 66: 581-584.
- Lin, J., Yeh, K.S., Liu, H.T. and Lin, J.H. (2009). *Staphylococcus aureus* isolated from pork and chicken carcasses in Taiwan: prevalence and antimicrobial susceptibility. Journal of Food Protection, 72: 608-611.
- Martin, M.C., Fueyo, J.M., Gonzalez-Hevia, M.A. and Mendoza, M.C. (2004). Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. International Journal of Food Microbiology, 94: 279-286.

- McMahon, W.A., Aleo, V.A., Schultz, A.M., Horter, B.L. and Lindberg, K.G. (2003). 3 M Petrifilm Staph Express Count plate method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in selected types of meat, seafood, and poultry: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 86: 947-953. .
- Moon, J.S., Lee, A.R., Jaw, S.H., Kang, H.M., Joo, Y.S. and Park, Y.H. (2007). Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. *Journal of Food Protection*, 70: 2541–2548.
- Ng, D.L.K. and Tay, L. (1993). Enterotoxigenic strains of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready-to-eat foods. *Food Microbiology*, 10: 317–320.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A. and Poggiu, A. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 73–79.
- Normanno, T.G. and La Salandra, G. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 290–296.
- Oh, S.K., Lee, N., Cho, Y.S., Shin, D.B., Choi, S.Y. and Koo, M. (2007). Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. *Journal of Food Protection*, 70: 1153–1158.
- Omoe, K. and Ishikawa, M. (2002). Detection of seg, she and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of enterotoxins productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, she or sei genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 857-862.
- Paciorek, M.L., Kochman, M., Piekarska, K., Grochowska, A. and Windyg, B. (2007). The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3): 319-323.
- Redmond, E.C. and Griffith, C.J. (2003). Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *Journal of Food Protection*, 66: 130-161.
- Reji, M.W. and Den Aantrekker, E.D. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 1-11.
- Soltan-Dallal, M.M., Salehipour, Z. and Mehrabadi, Z.F. (2010). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in food samples based on the protein A gene polymorphic region DNA sequence. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(1): 18-21.
- Soriano, J.M., Rico, H., Molto, J.C. and Mares, J. (2002). Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food Control*, 13: 253-261.
- Tavakoli, H.R. and Riazipour, M. (2008). Microbial quality of cooked meat foods in Tehran University's restaurants. *Pakistan Journal of Medical Science*, 24: 595-599.

## Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* isolates from chicken nugget and ready to eat foods in Esfahan province by ELISA technique

Madahi, H.<sup>1</sup>, Rostami, F.<sup>1</sup>, Rahimi, E.<sup>2\*</sup>, Safarpour Dehkordi, F.<sup>3</sup>, Jalali, M.<sup>4</sup>

1- Msc Student of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, College of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3- Member of Young Research Club, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

4- Associate Professor, Infectious Disease and Tropical Medicine Research Center and School of Food Science and Nutrition, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

\*Corresponding author email: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(Received: 2013/10/19 Accepted: 2014/6/23)

### Abstract

This study was conducted to detect the classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken nugget and ready-to-eat foods in Esfahan province by ELISA technique. During summer 2012, a total number of 420 chicken nuggets was collected randomly from retailers of Esfahan province. The samples were subjected to bacteriological examinations. The isolates were analyzed for the production of enterotoxins using ELISA techniques. The ability to synthesize Staphylococcal enterotoxins (SEs) was determined in 20 of 24 (83.3%) isolates, which SEA was the most common (40%) enterotoxin found in the isolates. Afterwards, SEC (15%) and SED (10%) were the most detected enterotoxins. Amongst, three strains were able to synthesize both of the SEA and SED and three isolates were able to synthesize both of SEA and SEC. However, no isolate was able to produced SEE. Results showed that chicken nugget and ready-to-eat foods can potentially be a source of staphylococcal food poisoning. Therefore, it is important to study the prevalence of enterotoxigenic *S. aureus* in the other food types.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, Staphylococcal enterotoxins, Chicken nugget, ELISA