

مطالعه میزان شیوع ژن‌های آنتروتوکسین‌های معمول در استافیلوکوکوس آرنوس‌های جدا شده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز به روش Multiplex PCR

مهرداد اثنی عشری^{۱*}، جلال شایق^۲، آیت الله نصرالهی عمران^۳

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، تنکابن، ایران.
 ۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، استادیار گروه دامپزشکی، شبستر، ایران.
 ۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی، استادیار گروه میکروبیولوژی، تنکابن، ایران.
 * نویسنده مسئول مکاتبات: meh.esna2000@yahoo.com
 (دریافت مقاله: ۹۱/۷/۲۶ پذیرش نهایی: ۹۱/۱۱/۲۴)

چکیده

با توجه به اهمیت آنتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس موجود در شیر به عنوان یکی از منابع عمده مسمومیت‌های غذایی، بررسی روش‌های متعدد جداسازی، شناسایی و دسته‌بندی این آنتروتوکسین‌ها ضروری است. در این مطالعه توصیفی ۷۵ نمونه باکتری استافیلوکوکوس آرنوس جدا شده از شیر گاومیش برای بررسی وجود و حضور ژن‌های مربوط به آنتروتوکسین‌های معمول استافیلوکوکوس آرنوس با استفاده از روش Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین صورت که ابتدا DNA نمونه‌ها استخراج سپس برای اطمینان از استافیلوکوکوس بودن تمام نمونه‌ها به روش PCR مورد تأیید قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که از این تعداد نمونه باکتریایی یک جدایه دارای هر دو باند آنتروتوکسین‌های *seb* و آنتروتوکسین *sec* بود و سه جدایه دیگر فقط دارای آنتروتوکسین *sec* بودند و ژن مربوط به آنتروتوکسین A در هیچکدام از جدایه‌ها شناسایی نشد. بر اساس نتایج این تحقیق میزان شیوع تنوع ژن‌های مربوط به آنتروتوکسین‌های معمول در استافیلوکوکوس آرنوس‌های جدا شده از شیر گاومیش در شهرستان تبریز پایین می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس آرنوس، ژن آنتروتوکسین، شیر گاومیش، Multiplex PCR

مقدمه

آنتروتوکسین‌ها اهمیت بسزایی دارند (Shimi, 1996). این سموم پروتئین‌های محلول در آبی هستند که توسط سلول باکتری ترشح می‌شوند و به عنوان عامل استفراغ در مسمومیت‌های غذایی و گاستروانتریت‌ها مطرح می‌باشند (Shivram et al., 1985). آنتروتوکسین

استافیلوکوکوس آرنوس یک گونه باکتریایی بسیار مهم مولد مسمومیت غذایی در بسیاری از کشورهای جهان می‌باشد. این باکتری طیف وسیعی از ترشحات سمی را تولید می‌نماید. در میان سموم تولید شده

(Baron et al., 1994; Borelli et al., 2006; Iandolo,)
 1985; Shivram et al., 1989). از میان این روش‌ها
 روش پیشنهادی Mehrotra و همکاران دارای کاربرد
 فراوان‌تری است.

با توجه به اهمیت شیر گاو‌میش که دومین شیر
 مصرفی جهان و به ویژه آسیا بعد از شیر گاو محسوب
 می‌شود و نیز مصرف بسیار آن در کشورمان اهمیت
 بررسی ژن‌های مولد آنروتوکسین‌های استافیلوکوک‌های
 جدا شده از شیر گاو‌میش را بسیار افزایش می‌دهد
 هدف از این مطالعه بررسی فراوانی و تنوع ژن‌های مولد
 آنروتوکسین در *استافیلوکوکوس آرتوس*‌های جدا شده
 از شیر گاو‌میش‌های شهرستان تبریز به روش مولتی
 پلکس PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

تعداد ۷۵ باکتری *استافیلوکوکوس آرتوس* جدا شده
 از شیر گاو‌میش که قبلاً از سطح دامداری‌های سستی
 شهرستان تبریز جمع‌آوری شده بود تهیه و به عنوان
 نمونه‌های مورد استناد در این مطالعه استفاده شد. بر
 روی کلیه نمونه‌ها آزمایش‌های کامل بیوشیمیایی انجام
 شده و تعلق آنها به گونه *استافیلوکوکوس آرتوس* اثبات
 شده است.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۷۵ نمونه کشت داده شده در
 محیط آبگوشت قلب- مغز انجام شد. یک میلی‌لیتر از
 کشت‌های باکتریایی در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه
 سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از ریختن
 بافر لیز کننده شامل تریس ۱ مولار (pH=۷/۵)، کلرید
 سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، C-TAB ۲ درصد بر

استافیلوکوکوسی (SE) برخلاف آنروتوکسین‌های
 کلاسیک مثل کلراتوکسین روی سلول‌های اپیتلیال عمل
 نکرده بلکه اثر استفراغ‌زایی آنها به علت اثر روی عصب
 واگ و سمپاتیک است و بنابراین می‌توان سموم SE را
 بطور صحیح‌تر نوروتوکسین نامید (Soleimani Rahbar
 and Maleknejad, 2007).

در ابتدا ۵ سروتیپ از آنروتوکسین‌ها تحت نام‌های
 A, B, C, D و E شناخته شده بودند (Quinn et al.,
 2003; Roberson et al., 1996). البته سروتیپ C تحت
 گونه‌های کوچک‌تری به نام C₁, C₂ و C₃ را نیز دارد. به
 دنبال آن سروتیپ دیگری تحت نام F معرفی شده است
 که بعداً مشخص شد که همان توکسین TSST-1 است
 و بعد از آن هم سروتیپ‌های H و G و اخیراً سروتیپ I
 گزارش گردیده‌اند. از میان این آنروتوکسین‌ها،
 آنروتوکسین‌های A, B, C, D و E، آنروتوکسین
 معمول یا کلاسیک نامیده می‌شوند. آنروتوکسین A
 بیش از همه تولید می‌شود (Aragon-Alegro et al.,
 2007). سویه‌های آنروتوکسین‌زای *استافیلوکوکوس*
آرتوس می‌توانند یک یا چندین نوع از توکسین‌هایی را
 که از نظر سرولوژیکی متفاوت هستند هم‌زمان تولید
 کنند. روش استاندارد برای تشخیص سموم SE و پی
 بردن به وجود آنها در مواد غذایی راه‌های
 ایمنولوژیکی، بیولوژیکی و سرولوژیکی می‌باشد. با
 این وجود روش‌های مولکولی برای تشخیص ژن‌های
 مولد سموم SE نیز به طور گسترده‌ای توسعه یافته‌اند.
 در این میان روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR از
 اهمیت فراوانی برخوردارند. تا امروزه حدود چند روش
 مولتی پلکس PCR متفاوت برای شناسایی
 آنروتوکسین‌های کلاسیک باکتری پیشنهاد شده است

انجام PCR برای ژن نوکلئاز

واکنش زنجیره ای پلی‌مراس در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی ۰/۴ میکرومولار (جدول ۱) و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. واکنش زنجیره پلیمراسی با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورس و با استفاده از ژل داکيومنت عکس‌برداری انجام گرفت.

روی رسوب مخلوط در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت در بن ماری قرار داده شده و سپس ویال‌های حاوی سلول‌های لیز شده به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال‌های دیگر منتقل و هم حجم آن کلروفرم-ایزوامیل‌الکل با نسبت‌های ۱:۲:۴ به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در ویال و برداشتن لایه رویی و انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس 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- قرار داده شد. با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ g DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید.

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

نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه باند	منبع
<i>nuc</i>	NucF NucR	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTI-3' 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'	۲۷۵	Brakstad et al., 1992

پرایمرهای اختصاصی ۰/۴ میکرومولار و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) مخلوط واکنش را تشکیل می‌دادند. واکنش زنجیره پلیمراسی با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۲ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه

انجام مولتی پلکس PCR برای ژن‌های آنروتوکسین در این مطالعه روش تعیین حضور آنروتوکسین‌های کلاسیک با استفاده از مولتی پلکس PCR طراحی شده توسط Mehrotra و همکاران (۲۰۰۰) به انجام رسید. این واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از پرایمرهای *sea*، *seb*، *sec*، *sed*، *see* برای باکتری‌ها انجام شد که توالی پرایمرهای اختصاصی در جدول ۲ آورده شده است. کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر،

بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ عکس‌برداری قرار گرفت.

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR جهت تشخیص ژن‌های کلاسیک آنتروتوکسین

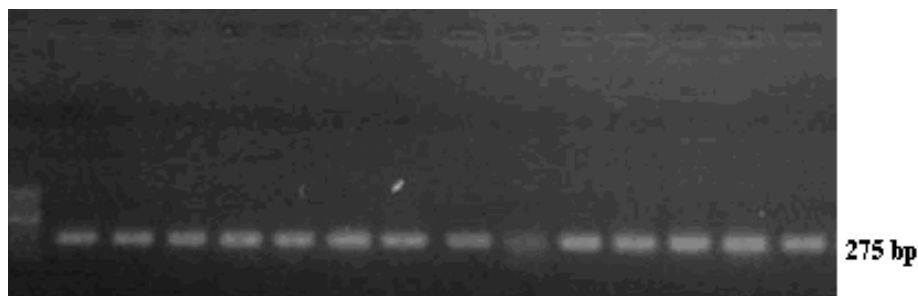
نام ژن	نام پرایمر	توالی	اندازه باند	منبع
<i>sea</i>	GSEAR-1 GSEAR-2	F; GGTTATCAATGTGCGGGTGG R; CGGCACCTTTTTCTCTTCGG	۱۰۲	Mehrotra et al., 2000
<i>seb</i>	GSEBR-1 GSEBR-2	F; GTATGGTGGTGTAACTGAGC R; CCAAATAGTGACGAGTTAGG	۱۶۴	Mehrotra et al., 2000
<i>sec</i>	GSECR-1 GSECR-2	F; AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG R; CACACTTTTAGAATCAACCG	۴۵۱	Mehrotra et al., 2000
<i>sed</i>	GSEDR-1 GSEDR-2	F; CCAATAATAGGAGAAAAATAAAAG R; ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC	۲۷۸	Mehrotra et al., 2000
<i>see</i>	GSEER-1 GSEER-2	F; AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC R; CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	۲۰۹	Mehrotra et al., 2000

یافته‌ها

واکنش PCR برای تأیید گونه آرنئوس

ژن نوکلئاز باکتری‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای ذکر شده در مواد و روش‌ها طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس تکثیر داده شد (شکل ۱). محصولات تکثیر با اندازه‌ی تقریبی ۲۷۵ جفت نوکلئوتید و به صورت تک

نوار حاصل شدند. برای نشان دادن اندازه‌ی قطعات تکثیری از DNA Ladder ۱۰۰ bp استفاده شد. همه ایزوله‌های جداسازی توسط تکثیر ژن نوکلئاز مورد تأیید قرار گرفتند.

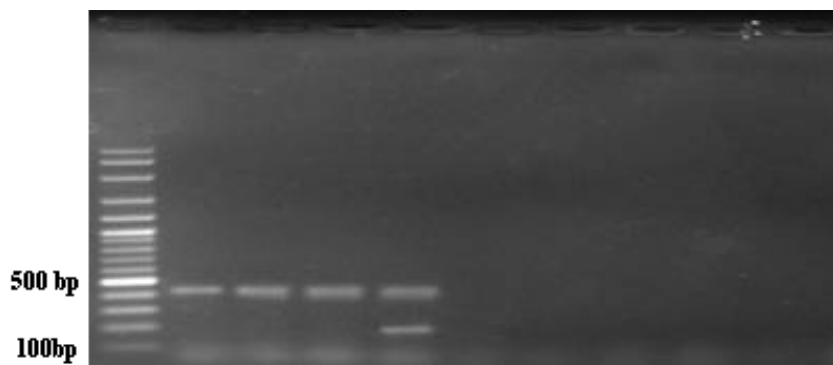


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های ۳۵ تا ۶۰ جداسازی شده از شیر گاومیش

Multiplex PCR برای حضور ژن‌های آنروتوکسین

نتایج مربوط به مولتی پلکس PCR در شکل ۲ نشان داده شده است، حضور باند ۱۶۴ bp نشانگر وجود ژن *seb*، حضور باند به اندازه ۴۵۱ bp نشانگر ژن *sec*، حضور باندهای ۱۰۲ bp و ۲۷۸ bp و ۲۰۹ bp به ترتیب نشانگر حضور توکسین‌های *see*، *sed* و *sea* در نمونه‌های مورد آزمایش‌اند.

از میان ۷۵ جدایه مورد مطالعه یک جدایه دارای هر دو باند ۱۶۴ و ۴۵۱ جفت بازی یعنی دارای *seb* و *sec* بوده و سه نمونه با حضور باند ۴۵۱ bp دارای آنروتوکسین *sec* بودند.



شکل ۲- الکتروفورز محصول مولتی پی سی ار در آگارز ۱/۵ درصد

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه بر روی مسمومیت‌های غذایی با منشا استافیلوکوکوس آرتوس به قرن ۱۹ باز می‌گردد (Abbar, 2010)، زمانی که به نظر می‌رسید شیر و فرآورده‌های آن اهمیت زیادی در خصوص چنین مسمومیت‌ها دارند. بیشتر مطالعات آلودگی شیر را در مقایسه با سایر فرآورده‌های آن پائین‌تر گزارش می‌کنند اعتقاد بر این است که میزان آلودگی فرآورده‌های شیر بدلیل آلودگی‌هایی است که در طی فرآیند تولید آنها اتفاق می‌افتد (Bennet, 1986).

ولی تاکنون مطالعات مشابه اندکی در خصوص فراوانی آلودگی در شیر گاو میش به انواع آنروتوکسین‌های تولید شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس انجام شده بطوری‌که مطالعه مستقلی در این خصوص وجود ندارد (Rahimi, 2011).

چندین تحقیق مشابه بر روی نمونه‌های گاو در دنیا انجام گرفته که به برخی از آنها اشاره می‌شود: مطالعه‌ای توسط رحیمی و همکاران بر روی شیر گوسفند، بز و گاو میش در استان‌های اصفهان، چهار محال بختیاری و خوزستان انجام گرفت که درصد آلودگی شیر گاو میش را بالاتر یعنی ۱۵/۸ درصد گزارش کرده است (Rahimi, 2011).

تا کنون چندین مطالعه در خصوص میزان آلودگی شیر گاو به انواع ژن‌های مولد آنروتوکسین توسط استافیلوکوکوس آرتوس در دنیا و نیز در کشور ما انجام پذیرفته است (Gilmour et al., 1990; Rahimi,)

۷۲ نمونه شیر از تانک‌های ذخیره شیر از ۱۲ جایگاه حیوانات اهلی شیرده در طی ۳ فصل مختلف (زمستان، بهار، تابستان) جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار دادند که از ۷۲ نمونه، ۱۵ نمونه (۲۰/۸٪) مثبت برای حداقل SE I می‌باشد (Rahimi, 2011).

در این مطالعه از تعداد ۷۵ جدایه استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از گاومیش مورد مطالعه، ۴ جدایه (۵/۴٪) حاوی حداقل یک ژن مربوط به آنروتوکسین بودند. اگرچه در مطالعه‌ای که توسط Rahimi و همکاران بر روی شیر گوسفند، بز و گاومیش در استان‌های اصفهان، چهار محال بختیاری و خوزستان به روش الیزا انجام شده درصد آلودگی شیر گاومیش بالاتر یعنی ۱۵/۸ درصد گزارش شده است. البته روش الیزا می‌تواند آنروتوکسین‌های تولیدی را نشان دهد و احتمالاً می‌بایست فراوانی ژن‌های مولد تولید آنروتوکسین بیش از این باشد. با این وجود بدلیل حجم کم نمونه‌های گاومیشی مطالعه مذکور (۱۹ نمونه) نیاز به مطالعه دیگری با حجم نمونه بالاتر و روش قابل مقایسه‌تر جهت مقایسه نتایج لازم می‌باشد (Rahimi, 2011).

مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعاتی که در خصوص میزان حضور ژن‌های مولد آنروتوکسین در خصوص شیر گاو انجام شده و گاه تا ۲۰ درصد نیز شیوع آن گزارش گردیده است میزان اندکی را گزارش می‌نماید (Rahimi, 2011). شاید یکی از دلایل آن نیز به میزان دخالت اندکی برگردد که در خصوص شیر گاومیش انجام می‌گیرد. البته مطالعات دیگری نیز وجود دارند که این میزان را تا ۴ درصد گزارش کرده اند (Gilmour et al., 1990).

پژوهش دیگر صورت گرفته توسط Gilmour نشان داد که ۶-۳/۹ درصد از سویه‌های جدا شده از شیر گاوهای طبیعی قدرت تولید آنروتوکسین دارند (Gilmour et al., 1990).

نتایج مطالعات دیگر توسط Morandi و همکاران و Normanno و همکاران در ایتالیا نشان دادند که درصد بالایی از سویه‌ها که از گاو جدا شدند SEA و SED را تولید می‌کنند در حالی که سویه‌های جدا شده از بز و گوسفند SEC را تولید می‌کنند (Morandi et al., 2007; Normanno et al., 2005).

در مطالعه دیگری که توسط Ghaleb Adwan و همکاران در فلسطین بر روی آنروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرتوس انجام گرفت مشاهده شد که از ۱۰۰ نمونه استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده (۵۲ نمونه از شیر گوسفند و ۴۸ نمونه از شیر گاو)، ۳۷ نمونه (۳۷٪) دارای ژن‌های SE بودند. هیچ‌کدام از نمونه‌های آنروتوکسین استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده، حامل بیش از ۱ ژن توکسین نبودند. بیشتر آنروتوکسین‌های استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده در مطالعه فوق شامل آنروتوکسین‌های SEA، SEC و یا SED بودند (Silva et al., 2005).

در مطالعه دیگری که بر روی ژن‌های آنروتوکسین استافیلوکوکوس آرتوس از ورم پستان گاو و مخزن ذخیره شیر در ایتالیا انجام گرفت، ژن‌های sed seg sei و sea گزارش شده است (Andrea, 2004).

در مطالعه دیگری که در اصفهان توسط Rahimi و همکاران بر روی جستجوی آنروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکوس آرتوس در شیر خام گاو به روش الیزا انجام گرفت، نتایج زیر مشاهده شدند: برای این هدف

(1990). مطالعات دیگر در ایران این میزان را در شیر گاو برای آنتروتوکسین‌های *seb*، *sea*، *seb+sea* به ترتیب ۱۵/۶، ۹/۳ و ۶/۲ درصد گزارش نموده است (Ahari et al., 2008). تحقیقات مشابه در کشور ما بر روی شیر و فرآورده‌های آن و شیر به گزارش آنتروتوکسین‌های *sec*، *seb*، *sea* و *see* انجامیده که سهم *sea* از این شیوع بیشتر است (Ahari et al., 2008). این امر احتمالاً به علت ارتباط بیشتر فرآورده‌های شیری و شیر گاوی با منابع آلودگی ثانویه به ویژه منابع حیوانی مربوط می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایاننامه دوره کارشناسی ارشد نویسنده اول است که بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن تشکر و قدردانی می‌گردد.

در مطالعه حاضر از تعداد ۴ نمونه سه نمونه دارای آنتروتوکسین نوع *Sec* و یک نمونه علاوه بر این آنتروتوکسین همزمان حاوی ژن *Seb* نیز بود. البته این امر در نوع خود چیز تازه ای نیست چراکه *Sec* عمدتاً از منشا حیوانی جدا می‌شود و *Sea* که غالباً نسبت به بقیه توکسین‌ها فراوانتر جدا می‌گردد بیشتر منشا انسانی دارد. این امر خود به کم بودن میزان دستکاری انسانی در خصوص شیر گاو می‌گردد. مطالعات مختلف در خصوص شیر گاو میزان *Sea* را بیشتر گزارش کرده اند (Gilmour et al., 2011). این میزان در مطالعه Rahimi و همکاران تا ۱۲/۵ درصد گزارش شده است (Rahimi, 2011). بررسی تولید آنتروتوکسین توسط Gilmour و همکاران در خصوص شیر گاو نشان می‌دهد که ۸۰٪ ژن‌ها از نوع *sea* و ۳۳٪ ژن‌ها از نوع *seb* می‌باشند (Gilmour et al., 2011).

منابع

- سلیمانی رهبر، ع.ا. و مالک نژاد، پ. (۱۳۸۶). اصول میکروبی شناسی دامپزشکی و بیماری‌های میکروبی، انتشارات دانشگاه تهران.
- شیمی، ا. (۱۳۷۶). باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی، مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی، صفحات: ۸۵-۹۴.
- Abbar, M. (2010). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in domestic dairy products. Iranian Journal of Microbiology, 2(3): 137-142.
- Ahari, H., Shahbazzadeh, D., Misaghi, A. and Pourshafie, M. (2008). Detection and Antibiogram of *Staphylococcus aureus* in Non Pasteurized Milk Samples from Tehran Province Restricts And Compare to Bacterial Culture. Journal Veterinary Research, 63(5): 321-326.
- Andrea, S., Leonardo, A., Maria, C.F., Cosima, A., Christoph, L. and Roberto, R. (2004). Occurrence of enterotoxin genes and macrorestriction analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and bulk-tank milk amples in Italy. An epidemiological study. Italian Journal, 3: 47-53.
- Aragon-Alegro, L.C., Konta, E.M., Suzuki, K., Silva, M.G., Fernandes Junior, A., Raal, R. and Rall, V.L.M. (2007). Occurrence of coagulase positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. Food Control, 18: 630-634.

- Baron, E.J., Peterson, L.R. and Finegold, S.M. (1994). Baily and Scotts Diagnostic Microbiology, 9th Edition, Mosbey-Pear book, Inc, pp. 321-332.
- Bennet, R.W. (1986). *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. Journal of Food science, 51: 1337-39.
- Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Santos, D.A., Carmo, L.S., Dias, R.S., Silva, M.C.C. (2006). Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 37: 545-550.
- da Silva, E.R., do Carmo, L.S. and da Silva, N. (2005). Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. Veterinary Microbiology, 106: 103-107.
- Rahimi, E., Mommtaz, H., Shakerian, A., Kavyani, H.R. (2012). The detection of classical enterotoxins of *staphylococcus aureus* in raw cow milk using the ELISA method. Turk. J. 36(3): 319-322.
- Gilmour, A. and Harvey, J. (1990). *Staphylococci* in milk and milk products. Journal of Applied Microbiology, 147s-166s.
- Iandolo, J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. Annual Review Microbiology, 43: 375-402.
- Kapur, V., Sischo, W.M., Greer, R.S., Whittam, I.s. and Musser, J.M. (1995). Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Journal of Clinical Microbiology, 33(2): 376-380.
- Mehrotra, M., Wang, G., Johnson, W.M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin Resistance. Journal of Clinical Microbiology, 38: 1032-1035.
- Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. Veterinary Microbiology, 124: 66-72.
- Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N.C. and Celano, G.V. (2005). Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology, 98(1): 73-79.
- Rahimi, E. (2011). Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in raw sheep, goat, camel, and water buffalo milk by ELISA method. Comparative clinical pathology, 1383-4.
- Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M. and Besser, T.E. (1996). Prevalence of coagulase-Positive staphylococci other than *staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. American Journal of Veterinary Research, 57(1): 54-58.
- Shimi, A. (1996). Veterinary bacteriology and bacterial disease, Jahad publishing. pp, 85-94 [In Farsi].
- Shivram, S. and kelar, S.S. (1985). Compartire Study of markers of pathogenic staphylococci. Indian Journal of Medical Research, 82: 194.
- Soleimani Rahbar, A.K. and Maleknejad, P. (2006). Medical Microbiology. Tehran University Press [In Farsi].
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2003). Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell publishing.

Prevalence of genes encoding the classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo milk in Tabriz area by multiplex PCR

Esnaashari, M.^{1*}, Shayegh, J.², Nasrollahi Omran, A.³

1- Msc student of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

2- Assistant Professor of Veterinary Department, Shabestar branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

3- Assistant Professor of Microbiology Department, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

*Corresponding author email: meh.esna2000@yahoo.com

(Received: 2012/10/17 Accepted: 2013/2/12)

Abstracts

Isolation, identification and grouping of staphylococcal enterotoxins in milk is of great importance, since these toxins are considered as a major potential source of humans illness. In this study, 75 *staphylococcus aureus* strains isolated from buffalo milk were assessed. For this, extracted DNA was analysed by multiplex-PCR for the presence and diversity of genes encoding the common classical staphylococcal enterotoxins. Results revealed that one of the isolates harboured both *sec* and *seb* genes; meanwhile, three other isolates contained merely *sec* gene. Moreover, the gene encoding the production of enterotoxin-A was not detected in any of the isolates. It was concluded that the diversity of genes encoding the classical enterotoxins of *S. aureus* isolated from Tabriz area was low.

Key word: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxins, Buffalo milk, Multiplex-PCR.