مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۸، دوره ۷۴، شماره ۱، ۷۲-۶۵
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.239082.2677

ارزیابی فراوانی ژن‌های انتروتوکسین زای استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های گوشت چرخ شده اغذیه فروشی‌های استان مازندران

مریم عزیزخانی*، فهیمه توریان
گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری‌های نوین آمل، آمل، ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ مرداد ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۹ مهر ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین باکتری‌های بیماریزا برای انسان به شمار می‌رود که به راحتی طی ذبح، فرآوری، بسته بندی، نگهداری و دستکاری گوشت و محصولات گوشتی به علت عدم رعایت موازین بهداشتی به ماده غذایی انتقال می‌یابد و موجب بروز مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌گردد.

هدف: هدف این مطالعه بررسی آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس و ارزیابی فراوانی ژن‌های عامل انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در گوشت گوساله چرخ شده خام و طبخ شده در اغذیه فروشی‌های استان مازندران بود.

روش کار: ۱۵۰ نمونه گوشت چرخ شده گوساله (۹۵ نمونه خام و ۵۵ نمونه طبخ شده) به روش نمونه گیری تصادفی از اغذیه فروشی‌های استان مازندران، طی خرداد و تیر ماه ۱۳۹۶، جمع آوری گردید. شمارش استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از محیط بردپارکر آگار انجام شد. فراوانی ژن‌های انتروتوکسین‌های A-E و G، H، I و شبه J با تکنیک PCR لحظه به لحظه ارزیابی گردید.

نتایج: ۶۸درصد از نمونه‌ها آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بودند. میانگین تعداد در نمونه‌های گوشت چرخ شده خام و طبخ شده، به ترتیب، برابر با $۳/۱\times۱۰^{۵}$ cfu/g و $۵/۷\times۱۰^{۳}$ cfu/g بود. در میان ۹۲ جدایه، ۲۳ جدایه (۲۵درصد) حامل ژن کد کننده انتروتوکسین بودند. از ۲۳ جدایه فوق، ۱۵ جدایه (۶۵/۲درصد) حامل یک ژن انتروتوکسین و بقیه حامل بیش از یک ژن بودند. دو جدایه دارای ژن‌های SEA و SEC، دو جدایه حامل ژن‌های SEA و SEE، یک جدایه حامل ژن‌های SEA و SEG، یک جدایه حامل ژن‌های SEC و SEI، یک جدایه حامل ژن‌های SEC، SEA و SEG و یک جدایه حامل ژن‌های SEE و SEG بود.

نتیجه گیری نهایی: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تعداد سویه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های گوشت چرخ شده در اغذیه فروشی‌های استان مازندران به میزان قابل ملاحظه‌ای بالاست.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین، ژن، گوشت

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۱-۴۴۲۷۱۰۵۷ نمابر: ۰۱۱-۴۴۲۷۱۰۵۴ Email: m.azizkhani@ausmt.ac.ir

How to Cite This Article
Azizkhani, M., Tooryan, F. (2019). Detection of enterotoxin coding genes of *Staphylococcus aureus* strains isolated from ground meat in retail shops in Mazandaran. J Vet Res, 74(1), 65-72. doi: 10.22059/jvr.2018.239082.2677

مقدمه

بیماری‌های منتقله از راه غذا معضل اصلی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌شوند که سالانه میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شوند. استافیلو کوکوس اورئوس به عنوان دومین و گاهی سومین علت مهم این بیماری‌ها محسوب می‌شود(۷). مسمومیت غذایی استافیلوکوکی که به علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیك آن در مواد غذایی ایجاد می‌شود برخلاف مسیر آرام خود خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای به بار می‌آورد (۳). این باکتری به علت سهولت رشد در شرایط مختلف، از انواع مواد غذایی مانند شیر و محصولات لبنی، محصولات گوشتی، سبزیجات و سالاد، غذاهای پخته و نمکی بخصوص مواد غذایی که تهیه آن‌ها مستلزم دستکاری‌های طولانی باشد قابل جدا شدن است (۱۱). استافیلو کوکوس اورئوس انواع مختلفی از انتروتوکسین‌ها را تولید می‌نماید و در میان توکسین‌های باکتریایی خارج سلولی (اگزوتوکسین‌ها)، توکسین‌های استافیلو کوکوس اورئوس بالاترین درصد احتمال ایجاد بیماری را دارند. این انتروتوکسین‌ها، اگزوپروتئین‌های تك زنجیری مقاوم به حرارت با وزن مولکولی Da ۲۶۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ هستند که سندرم گاستروانتریت در انسان ایجاد می‌کنند. زنجیرهای پلی پپتیدی منفرد توسط یک پل دی سولفیدی به یکدیگر متصل شده و حلقه سیستینی ویژه‌ای را به وجود می‌آورند و تصور می‌شود که این حلقه قسمت سمی مولکول و مقاومت قابل ملاحظه این انتروتوکسین‌ها نسبت به حرارت باشد. در حال حاضر بیش از ۲۰ انتروتوکسین استافیلوکوکی متفاوت از نظر سرولوژی شناخته شده است که متشکل از انتروتوکسین‌های کلاسیك (A تا E) و انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی اخیرا تعریف شده (SEG تا SER و SEU) می‌باشند. مطالعات اخیر نشان داده که همه آن‌ها در ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی نقش ندارند. از بین انتروتوکسین‌های مختلف، نوع A و D اغلب عامل مسمومیت‌های غذایی هستند و انتروتوکسین A در ایجاد مسمومیت غذایی نسبت به سایر انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی بیشترین نقش را دارد (۱،۱۱). افزایش جمعیت استافیلو کوکوس اورئوس تا cfu/g ۱۰۵ و بلع حدود ng۱۰۰ از انتروتوکسین می‌تواند باعث بروز علائم مسمومیت استافیلوکوکی (شامل تهوع، استفراغ، دل پیچه، اسهال، احساس خستگی و سردرد) گردد (۷). همانطور که پیش تر ذکر گردید دستکاری مواد غذایی و نیز نگهداری ماده غذایی طبخ شده در شرایط دمایی نامناسب و یا دمای محیط (به ویژه در فصل تابستان) به مدت طولانی (مانند آنچه در اغلب اغذیه فروشی‌ها رخ می‌دهد) موجب افزایش تعداد استافیلو کوکوس اورئوس و تولید انتروتوکسین می‌گردد و به علت مقاومت حرارتی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی حرارت دادن مجدد ماده غذایی موجب سالم سازی آن نمی‌گردد. از آنجا که گوشت منبع غذایی غنی برای رشد و فعالیت این باکتری به شمار می‌رود و شکل‌های مختلف آن به خصوص گوشت چرخ شده در اغذیه فروشی‌ها به میزان زیاد عرضه می‌گردد، در این مطالعه به بررسی میزان آلودگی به استافیلو کوکوس اورئوس و ارزیابی فراوانی ژن‌های عامل تولید انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در نمونه‌های گوشت چرخ شده خام و طبخ شده در اغذیه فروشی‌های استان مازندران پرداخته شد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه: تعداد ۱۵۰ نمونه گوشت چرخ شده گوساله (۹۵ نمونه خام و ۵۵ نمونه طبخ شده) به روش نمونه گیری تصادفی از اغذیه فروشی‌های استان مازندران، طی خرداد و تیر ماه ۱۳۹۶، جمع آوری گردید. نمونه گیری حتی الامکان به صورت استریل انجام و نمونه‌ها در کیسه‌های پلی اتیلن استریل در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. آزمون‌های مربوطه بلافاصله پس از تحویل نمونه‌ها به آزمایشگاه انجام گردید.

شمارش استافیلو کوکوس اورئوس: با استفاده از قاشق فلزی استریل g ۲۵ از نمونه گوشت چرخ شده برداشت شده و درهاون چینی استریل یکنواخت گردید. سپس، نمونه همگن شده با ml ۲۲۵ محلول آب پپتونه بافرشده (مرک، آلمان) به خوبی مخلوط و به مدت h ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شد. سپس رقت‌های مورد نظر تهیه و مقدار ml ۰/۱ از هر رقت در سطح سه پلیت حاوی محیط کشت برد پارکر آگار (مرک، آلمان) غنی سازی شده با زرده تخم مرغ و تلوریت پتاسیم انتقال داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری و در نهایت شمارش گردید. کلنی‌های سیاه، محدب، براق با یا بدون‌هاله روشن، جهت به دست آوردن کلنی‌های منفرد، روی محیط آگار خوندار حاوی ۵ درصد خون گوسفند کشت داده و به مدت h ۲۴ در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند. وجود استافیلو کوکوس اورئوس از طریق وضعیت همولیز روی آگار خوندار، رنگ آمیزی گرم، آزمون‌های تائیدی مانند واکنش کاتالاز (پراکسید هیدروژن ۰/۳درصد)، واکنش کوآگولاز و تخمیر گلوکز و مانیتول تائید گردید (۲۸).

استخراج DNA از استافیلو کوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌ها گوشت چرخ شده: محلول استخراج Tripure (روشه، ایالات متحده) جهت استخراج DNA به کار رفت و کلیه مراحل مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام شد. جهت بررسی کمی و تعیین غلظت DNA، دانسیته نوری ۲ ul از محلول حاوی DNA در طول موج nm ۲۶۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (مدل NanoDrop Spectrophotometre ۲۰۰۰ ThermoScientific,USA) قرائت و بر اساس ng/ul گزارش شد. نسبت میزان جذب در طول موج nm ۲۶۰ به nm ۲۸۰ (A۲۶۰/A۲۸۰) بیانگر عدم وجود آلودگی و خلوص DNA می‌باشد. DNA به دست آمده تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰ °C- نگهداری شد.

پرایمرها: پرایمرهای به کار رفته جهت انجام PCR (جدول ۱) از

شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) تهیه شد. جهت به دست آوردن منحنی ذوب پرایمرها دامنه حرارتی ۹۵-۷۰ °C با شیب ۱ °C/min اعمال شد.

انجام Real Time PCR: واکنش Real Time PCR جهت جستجوی ژن مولد انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی با استفاده از محلول Power SYBR Green (Applied Biosystems, USA) انجام شد، مستر میکس تهیه شده شامل پرایمرهای forward و reverse ۱ ul، الگوی DNA (غلظت نهایی ۱۰ ng/ul)، ۱۰ ul مستر میکس Power SYBR Green و آب فاقد نوکلئاز بود. واکنش در یک ترموسایکلر ABI PRISM ۷,۵۰۰ Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) انجام شد. شرایط چرخه حرارتی واکنش به صورت زیر بود: یک سیکل در ۵۰°C به مدت ۲ min، یک سیکل در ۹۵ °C به مدت ۲ min، ۴۰ چرخه در ۹۵ °C به مدت ۱۵ sec و ۶۰ °C به مدت ۱ min. آنالیز کلیه نمونه‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

آنالیز آماری: بررسی داده‌ها بر اساس آنالیز آماری توصیفی و با استفاده از نسخه ۲۲ نرم افزار SPSS انجام شد. نتایج شمارش باکتری به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شد.

نتایج

در این مطالعه، تعداد ۹۲ نمونه از ۱۵۰ نمونه مورد بررسی (۶۸درصد) آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شدند. میانگین تعداد در نمونه‌های گوشت چرخ شده خام و طبخ شده، به ترتیب، برابر با $3/1\times10^{5}$ cfu/g و $5/7\times10^{3}$ cfu/g بود. بالاترین میزان آلودگی در نمونه‌های گوشت خام مشاهده گردید و تفاوت معناداری میان میزان آلودگی نمونه‌های خام و پخته وجود داشت ($P<0/05$). در میان ۹۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۳ جدایه (۲۵درصد) حامل ژن کد کننده انتروتوکسین بودند. از ۲۳ جدایه فوق، ۱۵ جدایه (۶۵/۲درصد) حامل یک ژن مولد انتروتوکسین و بقیه حامل بیش از یک ژن بودند (جدول ۲). دو جدایه دارای ژن‌های SEA و SEC، دو جدایه حامل ژن‌های SEA و SEE، یک جدایه حامل ژن‌های SEA و SEG، یک جدایه حامل ژن‌های SEC و SEI، یک جدایه حامل ژن‌های SEC، SEA و SEG و یک جدایه حامل ژن‌های SEE و SEG بود.

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس از مهمترین باکتری‌های بیماریزا برای انسان به شمار می‌رود که واجد قابلیت تجمع و تکثیر روی پوست انسان و حیوانات می‌باشد. این باکتری به راحتی از طریق زخم‌های پوستی افراد، عطسه و سرفه، خاک، آب و هوا به ماده غذایی منتقل شده و در سراسر بافت گوشت طی ذبح، فرآوری، بسته بندی، نگهداری و دستکاری پخش می‌شود. عدم رعایت اصول و موازین بهداشتی در تهیه محصولات گوشتی باعث بروز میزان قابل ملاحظه‌ای از آلودگی و شیوع گسترده مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌گردد. فاصله زمانی طولانی بین آلوده شدن ماده غذایی تا زمان فروش و یا مصرف و نیز نگهداری ماده غذایی در دمای اتاق یا بالاتر از آن به مدت زیاد موجب افزایش تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و تولید مقدار کافی انتروتوکسین جهت ایجاد مسمومیت غذایی می‌گردد. از آنجا که گوشت منبع غذایی غنی برای باکتری‌ها به شمار می‌رود، طی فرایند تهیه ماده غذایی به خصوص در مراکز خرد عرضه غذاهای آماده، دستکاری غیربهداشتی محصولات گوشتی، تماس با ظروف و ابزار آلوده، تماس دست و لباس آلوده افراد با ماده غذایی و نگهداری محصول در شرایط دمایی نامناسب خطر تولید انتروتوکسین و احتمال بروز مسمومیت استافیلوکوکی را افزایش می‌دهد (۲۲).

درصد بالایی از مسمومیت‌های استافیلوکوکی در سراسر جهان در اثر مصرف گوشت خام یا پخته آلوده رخ می‌دهد چنانکه طی یک بررسی ۵ ساله در کره جنوبی، علت بروز حدود یک سوم از مسمومیت‌های استافیلوکوکی مصرف فرآورده‌های گوشتی بوده است (۲۶). در مطالعه حاضر، ۶۸درصد از مجموع نمونه‌های مورد بررسی به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند. میانگین تعداد باکتری در نمونه‌های گوشت چرخ شده خام معادل $3/1\times10^{5}$ cfu/g بود و میزان آلودگی در نمونه‌های طبخ شده که در دمای محیط و یا در یخچال ویترین اغذیه فروشی‌ها نگهداری می‌شدند به طور معناداری کمتر از نمونه‌های خام و برابر با $5/7\times10^{3}$ cfu/g بود. نتایج مشابهی توسط Tang و همکاران در سال ۲۰۱۷ در دانمارک به دست آمد که ۶۹درصد از نمونه‌های گوشت خام عرضه شده در خرده فروشی آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بوده اند(۲۴). در مطالعه Rahimi و همکاران در سال ۲۰۱۳، ۶۰/۳درصد از نمونه‌های گوشت خام مورد ارزیابی در اصفهان از لحاظ آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس مثبت تشخیص داده شدند و میانگین بار آلودگی به این باکتری $2/6\times10^{2}$ الی $4/8\times10^{3}$ cfu/g بود (۲۳). در مطالعه Al-Tarazi و همکاران در سال ۲۰۰۹ در اردن نیز ۸۰/۸ درصد از نمونه‌های گوشت خام و فرآوری شده به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بوده و میانگین تعداد این باکتری در نمونه‌ها $5/3\times10^{2}$ الی $5/2\times10^{4}$ cfu/g بود(۲)؛ لیکن در برخی دیگر از پژوهش‌ها سطح آلودگی پائین تر بوده است، به طور مثال Thapaliya و همکاران در سال ۲۰۱۷ میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های گوشت و محصولات گوشتی خام در ایالت آیووا (ایالات متحده) را ۲۷/۸ درصد (۲۵) و Marthenge و Ombui در سال ۲۰۰۷ میزان آلودگی را ۱۰/۵درصد گزارش نمودند(۱۶). همچنین، در پژوهشی که توسط Zargar و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد ۱۵/۶درصد از نمونه‌های گوشت گوساله و ۱۴/۸درصد از نمونه‌های گوشت گوسفند مورد بررسی در تهران آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بوده‌اند (۲۸). در یک بررسی گسترده در پنج شهر ایالات متحده، ۳۷درصد نمونه‌های گوشت گوساله آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده جهت بررسی فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در استافیلوکوکوس اورئوس.

نام پرایمر	توالی (۵'-۳')	طول (bp)	مرجع
sea-F	ATGGTGCTTATTATGGTTATC	۱۲۰	(۶)
sea –R	CGTTTCCAAAGGTACTGTATT		
seb-F	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	۱۶۴	(۱۷)
seb –R	CCAAATAGTGACGAGTTAGG		
sec-F	TTTTTGGCACATGATTTAATTT	۲۵۷	(۶)
sec –R	CAACCGTTTTATTGTCGTTG		
sed-F	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG		(۱۷)
sed –R	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC		
see-F	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	۱۷۸	(۶)
see –R	TAACTTACCGTGGACCCTTC		
seg-F	GTTAGAGGAGGTTTTATG	۱۹۸	(۸)
seg –R	TTCCTTCAACAGGTGGAGA		
seh-F	CAACTGCTGATTTAGCTCAG	۱۷۳	(۸)
seh –R	CCCAAACATTAGCACCA		
sei-F	GGC CAC TTT ATC AGG ACA	۳۲۸	(۸)
sei –R	AAC TTA CAG GCA GTC CA		
selj-F	GTTCTGGTGGTAAACCA	۱۳۱	(۸)
selj –R	GCGGAACAACAGTTCTGA		

جدول ۲. فراوانی ژن‌های عامل انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های گوشت چرخ شده عرضه شده در اغذیه فروشی‌های استان مازندران.

انتروتوکسین	تعداد ایزوله‌های حامل ژن			انتروتوکسین	تعداد ایزوله‌های حامل ژن		
	نمونه خام	نمونه پخته	مجموع		نمونه خام	نمونه پخته	مجموع
SEA	۵	۲	۷	SEG	۲	۳	۵
SEB	۰	۰	۰	SHE	۰	۰	۰
SEC	۴	۲	۶	SEI	۱	۰	۱
SED	۱	۱	۲	SEJ	۰	۰	۰
SEE	۲	۰	۲	SEs	۱۶	۷	۲۳

شدند (۲۷). تفاوت در نتایج مطالعات مختلف در خصوص بالا یا پائین بودن میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند به علت، به ترتیب، ضعف و یا رعایت موازین بهداشتی در کشتارگاه‌های مختلف باشد. از علل آلوده بودن گوشت خام به استافیلوکوکوس اورئوس می‌توان تماس لاشه با محتویات روده یزرگ و پوست دام، تماس باسطوح، ابزار و تجهیزات آلوده (مانند چاقو، اره و چرخ گوشت) یا انتقال آلودگی از افراد را برشمرد (۲۲)

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت خام بیشتر از محصولات گوشتی پخته می‌باشد، علت این امر، علاوه بر دلایل ذکر شده در بالا، آنست که شرایطی مانند pH و آب در دسترس در گوشت خام نسبت به محصولات گوشتی طبخ شده یا فرآوری شده برای رشد و فعالیت استافیلوکوکوس اورئوس مناسب تر است (۲۱). علت اصلی آلودگی گوشت به این باکتری وقوع آلودگی ثانویه در اثر دستکاری گوشت توسط افراد بیمار، عدم شستن دست‌ها پیش از تماس با ماده غذایی و نگهداری طولانی مدت ماده غذایی در دمای محیط می‌باشد(۵).

از آنجا که انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در مقادبر بسیار اندک نیز مسمومیت زا می‌باشند، بررسی وجود سویه‌های توکسین زای این باکتری به خصوص در مواد غذایی که طی فرایند دستکاری می‌شوند ضروری به نظر می‌رسد. احتمال آلودگی محصولات تهیه شده از گوشت چرخ شده از قبیل همبرگر، کباب لقمه و کباب کوبیده به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی قابل ملاحظه است چرا که حرارت به کار رفته طی تهیه این مواد غذایی قادر به از بین بردن انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت استافیلوکوکوس اورئوس نمی‌باشد. مطابق نتایج این پژوهش، از ۹۲ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۳ جدایه (۲۵درصد) حامل ژن مولد انتروتوکسین تشخیص داده شدند. وجود سویه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت خام و محصولات گوشتی علاوه بر مطالعه حاضر در مطالعات سایر

محققین نیز گزارش گردیده است. در برخی از پژوهش‌ها فراوانی سویه‌های انتروتوکسیژنیک بسیار بالاتر از کار حاضر اعلام گردیده، به طور مثال در مطالعه Marthenge و Ombui در سال ۲۰۰۷ فراوانی استافیلو کوکوس اورئوس حامل ژن انتروتوکسین ۶۶درصد بوده است (۱۶). در تحقیقی در چین نیز فراوانی جدایه‌های انتروتوکسیژنیک در نمونه‌های گوشت بز ۳۶/۸درصد گزارش شده است (۱۳)، بر خلاف نتایج فوق، در مطالعه Zargar و همکاران در سال ۲۰۱۴ در تهران ۱۷/۶درصد از سویه‌های مورد بررسی استافیلو کوکوس اورئوس حامل ژن مولد انتروتوکسین A بوده‌اند (۲۸). نتایج مطالعه Rahimi و همکاران در سال ۲۰۱۳ در اصفهان نیز نشان داد که از ۲۲۳ جدایه استافیلو کوکوس اورئوس، تنها ۳۰ جدایه (۱۳/۳درصد) انتروتوکسیژنیک بوده اند(۲۳). تفاوت در نتایج مطالعه ما با گزارشات دیگر محققین می‌تواند به علت تفاوت در روش‌های نمونه برداری، خطای افراد نمونه گیر، تعداد نمونه‌ها، فصل نمونه برداری، شرایط حمل به آزمایشگاه و روش‌های متفاوت کشت و شمارش باشد. همچنین، در برخی از تحقیقات تنها از روش‌های ایمنواسی جهت بررسی وجود سویه‌های انتروتوکسین زا استفاده شده در حالی که روش‌های دقیق تر ملکولی همچون PCR نتایج قابل اعتمادتری به دست می‌دهند.

در میان ۲۳ جدایه انتروتوکسیژنیک، ۱۵ جدایه (۶۵/۲درصد) حامل یک ژن مولد انتروتوکسین و بقیه حامل بیش از یک ژن بودند. دو جدایه (۸/۷درصد) دارای ژن‌های SEA و SEC، دو جدایه (۸/۷درصد) حامل ژن‌هایSEA و SEE، یک جدایه (۴/۳۵درصد) حامل ژن‌هایSEA و SEG ، یک جدایه (۴/۳۵درصد) حامل ژن‌های SEC و SEI، یک جدایه (۴/۳۵درصد) حامل ژن‌های SEC، SEA و SEG و یک جدایه (۴/۳۵درصد) حامل ژن‌های SEE و SEG بود. چنانچه از نتایج برمی آید، فراوانی جدایه‌های مولد انتروتوکسین A بیشتر از سایر انتروتوکسین‌ها بوده است. طبق متون منتشر شده SEA شایع ترین انتروتوکسین در سویه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلو کوکوس اورئوس می‌باشد و بیشترین نقش را در بروز مسمومیت استافیلوکوکی بر عهده دارد (۴،۱۹). در این مطالعه ژن SEA در میان سایر ژن‌های مولد انتروتوکسین مورد ارزیابی غالب (۳۰/۴درصد) بود که این نتیجه با یافته‌های Di Giannatale و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایتالیا (۳۰/۳درصد) و نیز سایر محققین همخوانی دارد (۱۰،۱۸،۲۰،۲۳) و پس از آن ژن‌های SEC (۲۶/۰۸درصد) و SEG (۲۱/۷درصد) بیشترین فراوانی را داشتند. ژن مولد انتروتوکسین‌های B، H و J در هیچ کدام از جدایه‌ها مشاهده نشد. در مطالعه‌ای در ژاپن، ۱۷/۹درصد از جدایه‌های استافیلو کوکوس اورئوس مولد SEA، ۲/۶درصد مولد SEA و SEB و ۲/۶درصد مولد SEA و SEC بودند (۱۴). در مطالعه Rahimi و همکاران در سال ۲۰۱۳، در ۱۸درصد جدایه‌ها ژن مولد SEG مشاهده گردید (۲۳) که مشابه نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد با این تفاوت که در یافته‌های ایشان ژن‌های مولد SEG و SEI همزمان در جدایه‌ها وجود داشته‌اند در حالی که در این پژوهش یک جدایه حامل ژن SEI به تنهایی بود. از آنجا که ژن‌های SEG و SEI در یک شاخه ژنتیکی قرار گرفته‌اند، یافتن ژن SEI بدون SEG می‌تواند به علت ایجاد جهش نقطه‌ای در ژن SEG و یا تغییر در شاخه‌ای باشد که این دو ژن در آن قرار گرفته‌اند (۱۲).

تفاوت جدایه‌ها در توانایی تولید انتروتوکسین‌های مختلف می‌تواند به منشای بوم شناختی باکتری، طبیعت جدایه، محیط رشد و مواد مغذی در اختیار باکتری (نوع ماده غذایی) مرتبط باشد (۹،۱۳)، چنانکه در موارد مسمومیت ناشی از مواد لبنی آلوده، SEA و سپس SED بیشترین فراوانی را در جدایه داشته‌اند (۱۵،۱۸). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تعداد سویه‌های انتروتوکسیژنیک استافیلو کوکوس اورئوس در نمونه‌های گوشت چرخ شده در اغذیه فروشی‌های استان مازندران قابل ملاحظه است و با توجه به بالا بودن تعداد مصرف کنندگان محصولات عرضه شده در این مراکز این مساله تهدیدی برای سلامت و بهداشت عمومی به شمار می‌رود.

نظر به یافته‌های این مطالعه و سایر پژوهش‌های مشابه و با توجه به ظهور سویه‌هایی از استافیلو کوکوس اورئوس که قادر به تولید انتروتوکسین‌هایی غیر از انواع کلاسیک (SEA–SEE) می‌باشند، خطر بروز مسمومیت‌های استافیلوکوکی جدی تر به نظر می‌رسد. انجام بررسی‌های گسترده تر جهت شناسایی ویژگی‌های این انتروتوکسین‌های نوظهور، تعیین نقش آن‌ها در بروز مسمومیت‌های استافیلوکوکی، عوامل مؤثر در بیان ژن‌های مرتبط با آن‌ها و همچنین، بسط روش‌های مولکولی تشخیص سریع سویه‌های انتروتوکسیژنیک و یا وجود انتروتوکسین‌های جدید در کنار انواع کلاسیک در مواد غذایی جهت جلوگیری از بروز مسمومیت به خصوص در مراکز عرضه مواد غذایی نیاز است.

تشکروقدردانی

این پژوهش در قالب پروژه تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام گردیده است.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Abdalrahman, L S., Wells, H., Fakhr, M.K. (2015). *Staphylococcus aureus* is more prevalent in retail beef livers than in pork and other beef cuts. Int J Food Microbiol, 4(2), 182–198. PMID: 25927961
2. Al-Tarazi, Y.H., Albetar, M.A., Alaboudi, A.R. (2009). Biotyping and enterotoxigenicity of Staphylococci isolated from fresh and frozen

meat marketed in Jordan. Food Res Int, 42, 374-9.

3. Verkade E., Kluytmans J. (2014). Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: Animal reservoirs and human infections. Infect Genet Evol, 21, 523–530. PMID: 23473831
4. Shawish, R.R., Al-Humam, N.A. (2016). Contamination of beef products with staphylococcal classical enterotoxins in Egypt and Saudi Arabia. GMS Hyg Infect Control, 11, 1–6. PMID: 27088066
5. Adugna, F., Pal, M., Girmay, G. (2018). Prevalence and antibiogram assessment of *Staphylococcus aureus* in beef at municipal abattoir and butcher shops in Addis Ababa, Ethiopia. Biomed Res Int, 1–7. https://doi.org/10.1155/2018/5017685 PMID: 29854759
6. Azizkhani, M., Misaghi, A., Basti, A.A., Gandomi, H., Hosseini, H. (2013). Effects of Zataria multiflora Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Int J Food Microbiol, 166, 249–255. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.020 PMID: 23558199
7. Balaban, N., Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. Int J Food Microbiol, 61,1-10. PMID: 11028954
8. Bania, J., Dabrowska, A., Bystron, J., Korzekwa, K., Chrzanowska, J., Molenda, J. (2006). Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. Int J Food Microbiol, 108, 36–41. PMID: 16380185
9. Barati, B., Saadati, M., Bahmani, M. (2006). Isolation and identification of type A enterotoxigenic *staphylococcus aureus* by multiplex PCR. Military Med J, 2, 119–28.
10. Di Giannatale. E., Prencipe, V., Tonelli, A., Marfoglia, C., Migliorati, G. (2011). Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. Vet Ital. 47 (2), 165–73. PMID: 21706469
11. Oniciucad, E.A., Nicolaua, A.I., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D. (2017). Presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food chain. Trend Food Sci Technol, 61, 49-59. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.002
12. Jarraud, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougel, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G. (2001). egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immunol, 166, 669–677 PMID: 11123352
13. Grispoldi, L., Massetti, L., Sechi, P., Iulietto, M.F., Ceccarelli, M., Karama, M., Popescu, P.A., Pandolfi, F., Cenci-Goga, B.T. (2018). Short communication: Characterization of enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. J Dairy Sci, In press. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15373
14. Kitai, S., Shimizu, A., Kawano, J., Sato, E., Nakano, C., Kitagawa, H., Fujio, K., Matsumura, K., Yasuda, R., Inamoto, T. (2005). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. J Vet Med Sci, 67(3), 269-74. PMID: 15805729
15. Upadhyay, N., Nara, S. (2018). Lateral flow assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in milk. Microchem J, 137, 435–442. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.12.011
16. Marthenge, J.M., Ombui, J.N. (2007). Detection of staphylococcal enterotoxins in milk and meat in Nairobi Kenya using enzyme linked immunosorbent assay. J Trop Microbiol Biotechnol, 3, 23-28.
17. 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. J Clin Microbiol, 38 (3),1032–1035. PMID: 10698991
18. Hoquea, M.N., Dasa, Z.C., Rahmana, A.N.M.A., Haiderb, M.G., Islam, M.A. (2018). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. Int J Vet Sci Med, 6(1), 53-60. https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008
19. 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., Celano, G.V. (2005). Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Int J Food Microbiol, 98(1), 73-79. PMID: 15617802

20. Ostyn, A., Buyser, M., Guillier, F., Krys, S., Hennekinne, J. (2012). Benefits of the combined use of immunological- and PCR-based methods for determination of staphylococcal enterotoxin food safety criteria in cheeses. Food Anal Methods, 5, 173–178. http://doi.org/10.1007/s12161-011-9244-y
21. Pepe, O., Blaiotta, G., Bucci, F., Anastasio, M., Aponte, M., Villani, F. (2006). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin A in breaded chicken products: detection and behavior during the cooking process. Appl Environ Microbiol, 72 (11), 7057–7062. http://doi.org/10.1128/AEM.00198-06 PMID: 17088378
22. Kadariya, J., Smith, T.C., Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal food-borne disease: An ongoing challenge in public health. Biomed Res Int, 1-9. http://doi.org/10.1155/2014/827965 PMID: 24804250
23. Rahimi, E., Nonahal, F., Ataye Salehi, E. (2013). Detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw meat in Esfahan, Iran. Health Scope, 2(2),95-98. http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.023
24. Tang, Y., Larsen, J., Kjeldgaard, J., Andersen, P.S., Skov, R., Ingmer, H. (2017). Methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark. Int J Food Microbiol, 249, 72–76. http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.001
25. Thapaliya, D., Forshey, B.M., Kadariya, J., Quick, M.K., Farina, S., O' Brien, A., Nair, R., Nworie, A., Hanson, B., Kates, A. (2017). Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA. Food Microbiol, 65, 122-129. http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.015 PMID: 28399994
26. Wallin-Carlquist, N., Marta, D., Borch, E., Radstrom, P. (2010). Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. Int J Food Microbiol, 141, 69–74. PMID: 20406714
27. Waters, A.E., Contente-Cuomo, T., Buchhagen, J., Liu, C.M., Watson, L., Pearce, K., Foster, J.T., Bowers, J., Driebe, E.M., Engelthaler, D.M., Keim, P.S., Price, L.B. (2011). Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. Clin Infect Dis, 52 (10), 1227–1230. http://doi.org/10.1093/cid/cir181 PMID: 21498385
28. Zargar, M.H.S., Hosseini Doust, R., Mobarez, A.M. (2014). *Staphylococcus aureus* enterotoxin A gene isolated from raw red meat and poultry in Tehran, Iran Int J Enteric Pathog, 2(3), 16085-16090.

Detection of Enterotoxin Coding Genes of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Ground Meat in Retail Shops in Mazandaran

Maryam Azizkhani, Fahimeh Tooryan

Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

(Received 15 August 2018, Accepted 21 October 2018)

Abstract:

BACKGROUND: *Staphylococcus aureus* is one of the most important pathogenic bacteria for human that is easily transferred during slaughtering, processing, packaging, storage and handling of meat and meat products as a result of poor hygienic principles, and causes staphylococcal food poisoning.

OBJECTIVES: The objective of this study was to evaluate the contamination of raw and cooked ground beef in retail shops of Mazandaran to *S. aureus* and also detection of enterotoxin-producing genes in the isolates.

METHODS: One-hundred fifty ground beef samples (95 raw and 65 cooked) were collected randomly from retail shops, 21 May-21 July 2017. *S. aureus* was counted via culturing on Baird Parker Agar medium. Detection of enterotoxins A-E and G, H, I and J producing genes was conducted applying real-time PCR technique.

RESULTS: 68% of samples showed *S. aureus* contamination. The average count in raw and cooked ground beef samples was 3.1×10^5 cfu/g and 5.7×10^3 cfu/g, respectively. From 92 *S. aureus* isolates, 23 isolates (25%) were carrying enterotoxin coding genes; amongst them 15 isolates (65.2%) were carrying just a single gene and the rest more than one gene. Two isolates carrying SEA+ SEC, two isolates SEA+SEE, one isolate SEA+SEG, one isolate SEC+SEI, one isolate SEA+SEC+SEG and one isolate SEE+SEG.

CONCLUSIONS: These results show that enterotoxigenic *S. aureus* strains are present on considerable numbers in retail ground meat in Mazandaran.

Keywords:

Enterotoxin, Genes, Meat, *Staphylococcus aureus*

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primers used to study the frequency of enterotoxin producing genes in Staphylococcus aureus.

Table 2. Frequency of genes of Staphylococcus aureus enterotoxins in minced ground meat samples distributed in Mazandaran province.

***Corresponding author's email: m.azizkhani@ausmt.ac.ir , Tel: 011-44271057, Fax: 011-44271054**