فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۲۵- ۳۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۵

ردیابی ژن‌های مولد انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ناگت مرغ در استان اصفهان به روش PCR

هاجر مداحی: دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، h.madahi@yahoo.com
ابراهیم رحیمی *: دانشیار بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ایران، ebrahimrahimi55@yahoo.com
محمد جلالی: دانشیار بهداشت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mjalali1343@gmail.com

چکیده

مقدمه: *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین به عنوان رایج‌ترین عامل مسمومیت غذایی استافیلوکوکی و به دنبال آن وقوع گاستروانتریت، اسهال و استفراغ شناخته شده است که وجود ژن‌های مولد انتروتوکسین در این باکتری می‌تواند علت اصلی بروز این علایم باشد. این مطالعه با هدف بررسی شیوع و فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از ناگت مرغ و غذای آماده مصرف در استان اصفهان به روش PCR انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در تابستان ۱۳۹۱، ۴۲۰ نمونه انواع ناگت مرغ از مراکز فروش استان اصفهان به شکل تصادفی جمع‌آوری شد. تمام نمونه‌ها از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کشت میکروبی آزمایش شدند. سپس، به منظور بررسی فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین، سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده آزمون PCR شدند.

نتایج: در این مطالعه، از ۴۲۰ نمونه ناگت مرغ ۲۴ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس*، مثبت بودند. از ۲۴ ایزوله جداسازی شده، ۲۳ ایزوله (۹۵/۸۳ درصد) حامل حداقل یک ژن مولد انتروتوکسین بودند. اصلی‌ترین ژن‌های ردیابی‌شده در بین *استافیلوکوکوس اورئوس*های مورد مطالعه *sea* (۲۵ درصد)، *sec* (۱۲/۵ درصد)، *sed +sej* (۴/۱۶ درصد)، *sed + seg* (۴/۱۶ درصد)، *seg + sei* (۴/۱۶ درصد)، *sea + seg* (۸/۳۳ درصد)، *seb + sej + sei* (۴/۱۶ درصد)، *sea + sed* (۱۲/۵ درصد) و *sea + sec + sej* (۱۲/۵ درصد) بودند که شایع‌ترین ژن مولد انتروتوکسین ردیابی شده ژن *sea* و پس از آن ژن *sec* گزارش شد.

بحث و نتیجه‌گیری: *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به‌راحتی از طریق آلوده کردن ناگت مرغ سبب شیوع مسمومیت غذایی استافیلوکوکی شود. بنابراین، می‌توان با اجرای استانداردهای کنترل کیفیت و امنیت مواد غذایی در حین فرآیند تولید، از حضور و رشد این باکتری در مواد غذایی جلوگیری کرد. از طرف دیگر به علت افزایش تمایل مردم به سرو غذاهای آماده مصرف و اهمیت سلامت عمومی جامعه، بررسی شیوع و فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ناگت مرغ ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن‌های مولد انتروتوکسین، ناگت مرغ، PCR

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت‌های زیادی که در علم بشر ایجاد شده است، بیماری‌های قابل انتقال از طریق غذا، سالانه خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را به جامعه تحمیل می‌کنند. به طور معمول، مسمومیت غذایی در انسان در اثر مصرف سم تولید شده توسط باکتری‌هایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] در مواد غذایی به وجود می‌آید (۱ و ۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* یک کوکسی گرم مثبت بوده که به شکل یک باکتری کلونیزه شده بر روی پوست و غشاهای مخاطی انسان و حیوانات یافت می‌شود. این باکتری عامل بروز مسمومیت غذایی، پنومونی، عفونت پوستی، عفونت سپتی سمی و سندرم شوک توکسیک (TSS[2])، در انسان است (۳). همچنین، این باکتری در حیوانات عامل ایجاد بیماری ورم پستان، التهاب موضعی استخوان‌ها و عفونت دستگاه ادراری است (۴). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به راحتی می‌تواند درصد بالای نمک و حتی دامنه وسیعی از اسیدیته و دما راتحمل کند (۱). این باکتری در گزارش‌های فراوانی از فرآورده‌های لبنی، فرآورده‌های گوشتی، جوجه، ماهی، غذاهای نمکی و تخمیری، آبمیوه‌ها، سبزیجات و حتی غذاهای پخته و نیمه پز، جداسازی شده است (۱). هوانگ و همکاران[3] در سال ۲۰۰۷ (۵) و کوون و همکاران[4] در سال ۲۰۰۶ (۶)، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را از موارد فساد گوشت طیور و محصولات آن، جداسازی کرده‌اند. بنابراین، ارزیابی حضور این باکتری در گوشت طیور و محصولات آن، ضروری به نظر می‌رسد.

عامل اصلی عفونت و مسمومیت استافیلوکوکی وجود ژن‌های مولد توکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* است (۷). تاکنون ۹ انتروتوکسین (*sea-see* و *seg-sej*) و ۹ توکسین مشابه انتروتوکسین (selk-selr و selu) در *استافیلوکوکوس اورئوس*های مولد مسمومیت‌های غذایی، شناخته شده است (۷، ۳ و۸). بررسی پیشین نشان می‌دهد که انتروتوکسین‌های نوع A و B استافیلوکوکی به عنوان عامل اصلی مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی در دنیا شناخته شده‌اند (۹).

ناگت مرغ به عنوان غذای سرخ شده محتوی مواد مغذی شامل چربی، پروتئین، ویتامین و مواد معدنی بوده که تمایل افراد به مصرف آن نه تنها در ایران بلکه در بیشتر کشورها در حال افزایش است (۱۰). اما تاکنون مطالعه ثبت شده‌ای از وضعیت آلودگی این فرآورده غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس*، در ایران انجام نشده است. پژوهش حاضر به منظور ردیابی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد انتروتوکسین در نمونه‌های ناگت مرغ عرضه شده در استان اصفهان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در تابستان ۱۳۹۱ در مجموع ۴۲۰ نمونه انواع ناگت مرغ تولید شده در ۹ شرکت مختلف از مراکز فروش در استان اصفهان جمع‌آوری، در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل و پس از نمونه‌گیری از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* و فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های کلاسیک آزمایش شدند. در این مطالعه تجربی نمونه‌ها به طور تصادفی ساده از سطح استان اصفهان انتخاب شدند.

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس: به منظور جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه با ۹۰ میلی‌لیتر از محلول استریل بافر

نمک فسفات مخلوط وسپس، به شکل هموژن درآورده شد. برای شمارش کلونی‌های باکتریایی از محیط برد پارکر آگار[۵] (ساخت شرکت دیفکو[۶]، آمریکا) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. رقت‌هایی از سوسپانسیون حاوی نمونه‌ها بر روی سطح پلیت برد پارکر آگار به طور سطحی کشت داده شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پرگنه‌های مشکوک رشد کرده در محیط برد پارکر بر روی سطح پلیت آگار خون[۷] (ساخت شرکت دیفکو، آمریکا) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، کلونی‌ها از نظر ریخت‌شناسی بررسی شدند. برای تایید تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* آزمون‌های گرم، کاتالاز، تخمیر مانیتول، کوآگولاز و آزمون وگس-پروسکاور[۸] (VP) بر روی پرگنه‌های مشکوک انجام گرفت (۱۱).

ردیابی ژن‌های کدکننده انتروتوکسین‌های *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej* به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): استخراج DNA از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از کیت استخراج DNA (ساخت شرکت فرمنتاز[۹]، لیتوانی) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت و حجم DNA استخراجی، در دانسیته نوری ۲۶۰ نانومتر بر اساس روش شرح داده شده توسط سامبروکوروسل[۱۰] اندازه‌گیری شد (۱۲). بعد از تخلیص DNA، تکثیر ژن‌های انتروتوکسین انتخابی (*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei* and *sej*) با استفاده از ۹ جفت پرایمر انجام شد. توالی پرایمرها و دماهای مورد استفاده برای تکثیر ژن در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱- پرایمرها ودماهای مورد استفاده برای ردیابی ژن‌های مولد انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*

دمای اتصال پرایمر (C)	سایز محصول (bp)	توالی نوکلئوتیدی پرایمر	ژن		منبع
۵۰	۱۲۰	Ttggaaacggttaaaacgaa	*SEA*-1	*Sea*	۱۵
		Gaaccttcccatcaaaaaca	*SEA*-2		
۵۰	۴۷۸	Tcgcatcaaactgacaaacg	*SEB*-1	*Seb*	۱۵
		Gcaggtactctataagtgcc	*SEB*-2		
۵۰	۲۵۷	Gacataaaagctaggaattt	*SEC*-1	*Sec*	۱۵
		Aaatcggattaacattatcc	*SEC*-2		
۵۰	۳۱۷	Ctagtttggtaatatctcct	*SED*-1	*Sed*	۱۵
		Taatgctatatcttataggg	*SED*-2		
۵۰	۲۰۹	Aggtttttcacaggtcatcc	*SEE*-1	*See*	۱۶
		Ctttttttcttcggtcaatc	*SEE*-2		
۵۵	۲۸۷	Aagtagacatttttggcgttcc	*SEG*-1	*Seg*	۱۷
		Agaaccatcaaactcgtatagc	*SEG*-2		
۴۶/۴	۲۱۳	Gtctatatggaggtacaacact	*SEH*-1	*Seh*	۱۷
		Gacctttacttatttcgctgtc	*SEH*-2		
۵۰	۴۵۴	Ggtgatattggtgtaggtaac	*SEI*-1	*Sei*	۱۷
		atccatattctttgcctttaccag	*SEI*-2		
۵۰	۱۴۲	Catcagaactgttgttccgctag	*SEJ*-1	*Sej*	۱۸
		Ctgattttaccatcaaaggtac	*SEJ*-2		

آزمون PCR[11] برای تشخیص ژن‌های کدکننده انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* مطابق روش ارائه شده توسط رال[12] و همکاران انجام شد (۱۳). به طور خلاصه فرآیند تکثیر ژن در ۲۵ میکرولیتر مخلوط شامل ۱ واحد آنزیم TaqDNAPolymerase (فرمنتاز، لیتوانی)، ۲۰۰ میکرومول dNTP (فرمنتاز، لیتوانی)، ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر x10 (فرمنتاز، لیتوانی)، ۱ میکرومول کلریدمنگنز (فرمنتاز، لیتوانی)، ۱۰ پیکومول پرایمر، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۱۷/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد (۱۴).

فرآیند تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت (ساخت شرکت اپندروف[13] آلمان) طی ۴ برنامه مختلف به شکل ارایه شده در جدول ۲ انجام شد.

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۲۰ تا ۶۰ دقیقه الکتروفورز و با استفاده از رنگاتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، محصول حاصل از الکتروفورز بر روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز تحت اشعه UV بررسی شد. از *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه استاندارد ATCC 25923، به عنوان کنترل مثبت و از DNase بدون آب به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

یافته‌های به‌دست آمده از آزمایش به منظور تحلیل به نرم افزار Excel انتقال داده شد. این اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS/18، آزمون‌های ضریب همبستگی و مربع کای در سطح $P\ value<0.05$ تجزیه و تحلیل آماری شد.

جدول ۲- فرآیند تکثیر ردیابی ژن‌های مولد انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس*

اهداف	دناتوراسیون[14]	اتصال پرایمرها[15]	تکثیر پرایمر[16]	تکرار
تشخیص ژن‌های *sea, seb, sec* and *sed* مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس*	۹۴ درجه سلسیوس ۲ دقیقه	۵۵ درجه سلسیوس ۲ دقیقه	۷۲ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه	۳۰ مرحله
تشخیص ژن *see* مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس*	۹۴ درجه سلسیوس ۲ دقیقه	۵۷ درجه سلسیوس ۲ دقیقه	۷۲ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه	۳۵ مرحله
تشخیص ژن‌های *seg, seh* and *sei* مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس*	۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه	۵۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه	۷۲ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه	۳۰ مرحله
تشخیص ژن *sej* مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس*	۹۴ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه	۶۲ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه	۷۲ درجه سلسیوس ۶۰ ثانیه	۳۰ مرحله

نتایج

وضعیت آلودگی نمونه‌های ناگت مرغ به *استافیلوکوکوس اورئوس* در جدول ۳ آورده شده است. از مجموع ۴۲۰ نمونه ناگت مرغ، ۲۴ نمونه آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (۵/۷ درصد). بالاترین میزان آلودگی در نمونه‌های شرکت C (۱۰ درصد) و کم‌ترین میزان آلودگی در نمونه‌های شرکت F (۲/۲ درصد) مشاهده شد. هیچ‌یک از ۴۵ نمونه شرکت H و ۴۰ نمونه شرکت I مورد مطالعه از نظر آلودگی به این پاتوژن مثبت نبودند. هیچ گونه اختلاف معناداری بین میزان شیوع باکتری در نمونه‌های ناگت در شرکت‌های مختلف تولیدکننده این محصول مشاهده نشد.

فراوانی ژن‌های مولد انتروتوکسین در بین ۲۴ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های ناگت مرغ جمع‌آوری‌شده از استان اصفهان در جدول ۴ آمده است. از بین ۲۴ سوش *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا

شده از نمونه‌های ناگت مرغ ۲۳ سوش حامل یک ژن مولد انتروتوکسین، ۸ سوش حامل دو ژن مولد انتروتوکسین و ۴ سوش حامل سه ژن مولد انتروتوکسین بودند. همچنین، ۲۳ ایزوله (۹۵/۸۳ درصد) حامل حداقل یک ژن مولد انتروتوکسین بودند. در ۲۴ سوش *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های ناگت مرغ ۹ ژنوتیپ متفاوت مشاهده شد. بیش‌ترین ژن‌های ردیابی شده در بین *استافیلوکوکوس اورئوس*های مورد مطالعه *sea* (۲۵ درصد)، *sec* (۱۲/۵ درصد)، *sed +sej* (۴/۱۶ درصد)، *sed + seg* (۴/۱۶ درصد)، *seg + sei* (۴/۱۶ درصد)، *sea + seg* (۸/۳۳ درصد)، *seb + sej + sei* (۴/۱۶ درصد)، *sea + sed* (۱۲/۵ درصد) و *sea + sec + sej* (۱۲/۵ درصد) بودند.

بررسی‌های آماری نشان دهنده اختلاف معنادار آماری ($P\ value < 0.05$) بین میزان شیوع انتروتوکسین A و سایر انتروتوکسین‌ها بود. هیچ گونه اختلاف آماری معناداری بین میزان شیوع انتروتوکسین‌ها در برندهای مختلف ناگت مرغ دیده نشد. همچنین، هیچ گونه اختلاف معناداری بین میزان شیوع انتروتوکسین‌های ترکیبی مختلف دیده نشد.

جدول ۳- میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس*های مولد انتروتوکسین‌های کلاسیک در نمونه‌های ناگت مرغ در استان اصفهان

برند مورد مطالعه	تعداد نمونه	نمونه‌های مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (درصد)
A	۵۰	۴ (۸)
B	۴۵	۴ (۸/۹)
C	۵۰	۵ (۱۰)
D	۵۰	۳ (۶)
E	۵۰	۳ (۶)
F	۴۵	۱ (۲/۲)
G	۴۵	۴ (۸/۹)
H	۴۵	۰ (۰)
I	۴۰	۰ (۰)
مجموع	۴۲۰	۲۴ (۵/۷)

جدول ۴- توزیع ژن‌های *Sea- Sej* در ۲۴ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از ناگت مرغ (Brand A- I)

ژنوتیپ	مجموع	نمونه‌های ناگت مرغ مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (Brand A-I)								
		n=4 A	n=4 B	n=5 C	n=3 D	n=3 E	n=1 F	n=4 G	n=0 H	n=0 I
A	۶	۳	۱	–	–	۱	۱	–	–	–
C	۳	۱	–	–	۲	–	–	–	–	–
d + j	۱	–	–	–	–	–	–	۱	–	–
d + g	۱	–	–	–	۱	–	–	–	–	–
g + i	۱	۱	–	–	–	–	–	–	–	–
a + g	۲	–	–	۲	–	–	–	–	–	–
b + j + i	۱	–	–	۱	–	–	–	–	–	–
a +d	۳	–	۲	–	–	–	–	۱	–	–
a + c + j	۳	–	–	۱	–	–	–	۲	–	–

بحث و نتیجه‌گیری

مسمومیت استافیلوکوکی یک مسمومیت با منشأ غذایی است که در اثر انتروتوکسین مقاوم به حرارت تولید شده، به ویژه گروه A در مقادیر بسیار اندک (۰/۵ تا ۰/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر) توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد می‌شود. این مسمومیت بیشتر مربوط به غذاهای آماده مصرفی است که پس از فرآیند آلوده شده‌اند از جمله انواع سالادها، ساندویچ‌ها، دسرها و غیره که این مسئله خطر بالقوه‌ای را برای سلامت جامعه به همراه دارد (۱ و ۲). به همین علت پژوهش‌های فراوانی در خصوص بررسی و تعیین شیوع سوش‌های توکسین‌زا و بررسی حضور ژن‌های مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی در تمام نقاط دنیا انجام شده است که تمام این بررسی‌ها گویای آلودگی صفر تا ۱۰۰درصدی موادغذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در مطالعه حاضر، به طور کلی میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های ناگت مرغ ۵/۷ درصد بود که این نتایج با نتایج بسیاری از مطالعات دیگر همخوانی دارد (۱ و ۱۹). در پژوهش انجام شده توسط نورمانو[۱۷] و همکاران، با استفاده از روش‌های RPLA[۱۸] و PCR به مدت ۳ سال (۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵) بر روی ۱۶۳۴ نمونه گوشت و شیر تولیدی در ایتالیا، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در حدود ۱۲/۸ درصد گزارش شد که به طور خاص، از ۹۹۳ نمونه گوشت در حدود ۱۰ درصد به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند (۱). در پژوهش سوریانو[۱۹] و همکارانش میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۳۴۲ نمونه غذای آماده مصرف، ۳/۵ و ۷/۶ درصد تعیین شد. همچنین آن‌ها در سال ۲۰۰۲ در اسپانیا با به‌کارگیری مبانی HACCP[۲۰] و GMP[۲۱] درصد آلودگی یک نوع غذای آماده مصرف به *استافیلوکوکوس اورئوس* را به میزان ۲۱درصد کاهش دادند (۱۹). مطالعه بوئی[۲۲] و همکاران در ویتنام گویای آن است که درصد شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۲۱۲ نمونه از غذاهای آماده مصرف ۲۲/۲ درصد است که این درصد بالای آلودگی می‌تواند به علت عدم کنترل دقیق بهداشتی در حین تولید غذا، آلودگی ثانویه در حین انتقال و نگه‌داری، استفاده مجدد از ظروف آلوده و یا شستشوی نامناسب ظروف و تجهیزات و بسته بندی‌های اولیه نامناسب باشد (۲۰). در مطالعه جن‌سی[۲۳] ۶۵/۶ درصد گوشت گوساله، ۵۵ درصد گوشت طیور، ۷۳/۹ درصد محصولات لبنی، ۷۷/۷ درصد غذاهای آماده مصرف و ۷۷/۷ درصد مواد اولیه غذاها از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند که میزان آلودگی این پژوهش بیشتر از نتایج مطالعه حاضر بود (۲۱). همچنین، در تایوان آلودگی لاشه مرغ به *استافیلوکوکوس اورئوس* را ۷/۸ درصد گزارش کردند که این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر کمابیش مشابه است (۲۲).

تاکنون مطالعاتی در ایران به منظور بررسی آلودگی گوشت طیور به *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است (۲۳- ۲۵). جوادی و صفرمشائی[۲۴] در مطالعه‌ای بر روی گوشت طیور نشان دادند که ۶۵ درصد نمونه‌های گوشت طیور از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بوده است (۲۳). در همین راستا نتایج حاصل از پژوهش فیضی[۲۵] و همکاران آلودگی گوشت طیور را به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۸۱/۷۵ درصد (۲۴) و اشراقی[۲۶] و همکاران ۳/۵ درصد گزارش کرده‌اند (۲۵).

علت اصلی اختلافی که در میزان شیوع باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعات متفاوت مشاهده شد، نوع نمونه مورد بررسی، روش نمونه‌گیری، روش

انجام آزمایش، منطقه جغرافیایی، شرایط آب و هوایی و سطح رعایت بهداشت است.

نتایج بررسی ما نشان دادند که از بین ۲۴ سوش *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از نمونه‌های ناگت، ۲۳ سوش (۹۵/۸۳ درصد) حامل حداقل یک ژن مولد انتروتوکسین بوده است. نتایج مشابهی در بررسی‌های پیشین، گزارش شده است (۷، ۸ و ۲۶). بیش‌ترین مقدار ژن مولد انتروتوکسین (SE) در سال ۲۰۰۲ توسط اوموئه[۲۷] و همکاران گزارش شده است (۱۰۰ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس*های ایزوله شده) (۱۷). آکیندون[۲۸] طی مطالعه‌ای نشان داد که ۶۷/۹۶ درصد از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده حامل یک یا تعداد بیش‌تری ژن *sea*، *sec*، *sed*، *seg*، *sei* و *sej* بودند که این داده‌ها بیش‌تر از نتایج حاضر بود (۸). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ژن‌های *sea*، *seg*، *sec*، *sed* و *sej* بیش‌ترین شیوع را در ناگت مرغ به خود اختصاص دادند. در بررسی‌های پیش از این، ژن‌های *seg*، *seh*، *sei* و *sej* بیش‌ترین شیوع (۵۷ درصد) را نسبت به ژن‌های *sea*، *seb*، *sec*، *sed* و *see* نشان دادند (۷). لیم[۲۹] و همکاران طی مطالعه‌ای تعیین کردند که ۲۲/۲۸ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس*های ایزوله شده حامل ژن *seb, sea* و *sec* بودند که در این بین انتروتوکسین a (*sea*) بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داده بود (۸۶/۴۸ درصد) که این مطالعه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همخوانی دارد (۲۶). گزارش پیشین نشان می‌دهد که تنها ۲/۹ درصد از ۷۰ گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* استخراجی از گوشت بوقلمون از نظر حضور ژن *sea* مثبت بودند در حالی‌که هیچ یک از ایزوله‌های جدا شده از نظر حضور ژن‌های *see*، *seg* و *sej* مثبت نبودند (۲۱). چیانگ[۳۰] و همکاران در پژوهش انجام شده بر روی عوامل مسمومیت غذایی در تایوان بیان کردند که از بین ژن‌های مولد انتروتوکسین‌های عامل مسمومیت، انواع *sea*، *seb* و *sec* به‌ترتیب با پراکندگی ۲۹/۲، ۱۹/۷ و ۶/۷ درصد نقش مؤثر داشتند (۲۷). در پژوهش انجام شده توسط پریرا[۳۱] و همکاران در پرتغال به منظور بررسی ژن‌های مولد انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در غذاهای آماده مصرف به روش PCR مشخص شد که ۶۹ درصد از *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از نمونه‌های گوشت حاوی ژن‌های مولد انتروتوکسین بودند ولی هیچ‌یک از *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از مواد غذایی حامل ژن‌های مولد انتروتوکسین *see* و *seb* نبودند؛ همانند مطالعه حاضر هیچ یک از *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های ناگت مرغ نیز قادر به تولید انتروتوکسین *see* نبودند (۲۸).

در ایران نیز پژوهش‌های مشابهی در این زمینه انجام شده است. در پژوهشی که توسط اشراقی و همکاران در شهرستان تهران بر روی ۴۵۸ نمونه از فرآورده‌های گوشتی خام و پخته انجام شد، ۲۵ درصد سویه‌های ایزوله شده حامل ژن *sec*، ۸ درصد حامل ژن *sea* و ۹ درصد حامل ژن *sea* + *sec* بودند (۲۵). سلطان دلال[۳۲] و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند از بین ۱۰۰ سوش *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از ۱۰۴۷ نمونه غذایی ۱۲ سوش حامل ژن مولد TSST[۳۳] و ۶۶/۷ درصد از آن حامل ژن‌های مولد انتروتوکسین عامل مسمومیت انسانی بودند (۲۹). علاوه بر آن در بررسی دیگری بر روی ۹۱۳ نمونه غذایی شایع‌ترین انتروتوکسین تولیدی در فرآورده‌های لبنی، انتروتوکسین D (۲۰ درصد) و C (۱۶ درصد) و در فرآورده‌های گوشتی، انتروتوکسین D (۶ درصد) و E (۳ درصد) گزارش شد (۳۰).

با توجه به این که این مطالعه نخستین گزارش از شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس*های انتروتوکسیژنیک در ناگت مرغ است و نتایج آن نشان می‌دهد با وجود حرارت اعمال شده در تهیه ناگت مرغ، محصول نهایی به *استافیلوکوکوس اورئوس*، هر چند ناچیز، آلوده بوده است. بنابراین روش Multiplex PCR می‌تواند به عنوان یک روش مناسب، ایمن و سریع برای تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* و عامل‌های حدت آن در نمونه‌های ناگت مرغ به کار گرفته شود. از طرف دیگر فرآیند تولید با شرایط غیر بهداشتی و رعایت نکردن بهداشت توسط کارکنان کشتارگاه طیور و کارخانه‌ها می‌تواند علت اصلی آلودگی گوشت و ناگت مرغ باشد. بنابراین، آموزش افراد شاغل در زمینه کنترل صحیح مسائل بهداشتی و نظارت در مرحله تهیه، حمل و نقل، نگهداری و عرضه با اجرای سیستم‌های GAPs[۳۴]، GMPs و HACCP به منظور جلوگیری از انتقال آلودگی میکروبی ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همه کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مرکز کنترل کیفی بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

(1) Normanno TG., La Salandra G. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 115 (3): 290- 6.

(2) Redmond EC., Griffith CJ. Consumer food handling in the home: areview of foodsafety studies. *Journal of Food Protection* 2003; 66 (1): 130- 61.

(3) Hermans K., Devriese LA., Haesebrouck F. *Staphylococcus aureus*. In: Gyles CL., Prescott JF., Songer JG., Thoen CO., editors. Pathogenesis of Bacterial Infections in animals. USA: Wiley Black well Publication; 2010. P 75- 85.

(4) Witte W. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; 44 (Suppl A): 1- 9.

(5) Hwang SY., Kim SY., Jang EJ., Kwon NH., Park YK., Koo HC., et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 117 (1): 99- 105.

(6) Kwon NH., Park KT., Jung WK., Youn HY., Lee Y., Kim SH., et al. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Veterinary Microbiology* 2006; 117 (1): 304- 12.

(7) Rosec JP., Gigaud O. *Staphylococcalenterotoxin* genes of classical and new typedetected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology* 2002; 77 (1- 2): 61- 70.

(8) Akinedon O., Annemuller C., Hassan A., Lammler C., Wolter w., Zschock M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2001; 8 (5): 959-64.

(9) Saadati M., Barati B., Shirazi M. Detection of *sea*, *sec* and seq genes in *Staphylococcus aureus* nasal sampling acquiring from healthy carrier. *Iranian South Medical Journal* 2008; 12 (8): 1- 16.

(10) Mallikarjunan PK., Ngadi MO., Chinnan MS. *Breaded fried food*. New York: Taylor and Francis group; CRC Press; 2010.

(11) Kiedrowski MR., Kavanaugh JS., Malone CL., Mootz JM., Voyich JM., Smeltzer MS., et al. Nuclease Modulates Biofilm Formation in CommunityAssociatedMethicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Plose One* 2011; 6 (11): 1- 16.

(12) Sambrook J., Russell DW. *Standard methods for DNA manipulations. MolecularCloningALaboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

(13) Rall VL., Vieira FP., Rall R., Vieitis RL., Fernandes AJR., Candeias JM., et al. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *Veterinary Microbiology* 2008; 132 (3- 4): 408- 13.

(14) Zouharova M., Rysanek D. Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenics trains from bulk tank milk. *Zoonoses Public Health* 2008; 55 (6): 279- 330.

(15) Johnson WM., Tyler SD., Ewan FE., Ashton FR., Pollard DR., Rozee KR. Detection of genesfor enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29 (3): 426- 30.

(16) Mehrotra M., Wang G., Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38 (3): 1032- 5.

(17) Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D., Ueda S., Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei*genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei*genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40 (3): 857- 62.

(18) Nashev D., Toshkova K., Isrina S., Salaisa S., Hassan AA., La¨mmler C., et al. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 233 (1): 45- 52.

(19) Soriano JM., Rico H., Molto JC., Mares J. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food Control* 2002*;* 13: 253- 61.

(20) Bui TMH., Zahid HM., Sucharit BN., Afework K., Nguyen VN., Alizadeh M., et al. Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aures* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. *Food Control* 2010; 21 (2): 166- 71.

(21) Gencay YE., Ayaz ND., Kasimoglu Dogru A. Enterotoxin Gene Profiles of *Staphylococcus aureus* and Other Staphylococcal Isolates from Various Foods and Food Ingredients. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi* 2010; 7 (2): 75- 80.

(22) Lin J., Yeh KS., Liu HT., Lin JH. *Staphylococcus aureus* isolated from pork and chicken carcasses in Taiwan: prevalence and antimicrobial susceptibility. *Journal of Food Protection* 2009*;* 72 (3): 608- 11.

(23) Javadi A., Safarmashaei S. Microbial profile of marketed broiler meat. *Middle-East Journal of Scientific Research* 2011*;* 9 (3): 652- 6.

(24) Feizi A., Nazeri M., Pilevar A. Isolation of *Staphylococcus* spp. *genera* from broiler breeder flocks in East Azerbaijan Province of Iran: Prevalence and antimicrobial susceptibility. *African Journal of Microbiology Research* 2012*;* 6 (1): 5819-23.

(25) Eshraghi S., Salehipur Z. Detection of tst, *sec*, *sea* and *sec* + *sea* in *staphylococcus aureus* isolated from different food sampling. *Tehran Medical University Journal* 2008*;* 67 (7): 470- 6.

(26) Lim S., Joo Y., Moon J., Lee A., Nam H., Wee S., et al. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of Veteterinary Medical Science* 2004*;* 66 (5): 581- 4.

(27) Chiang YC., Liao WW., Fan CM., Pai WY., Chiou CS., Tsen HY. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SEtypes in *Staphylococcu saureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* 2008*;* 121 (1): 66- 73.

(28) Pereira V., Lopes. Characterization for enterotoxin production, virulence factors and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology* 2009*;* 26 (3): 278- 82.

(29) SoltanDallal MM., Salehipour Z., Eshraghi S., FallahMehrabadi J., Bakhtiari R. Occurrence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat and dairy products by PCR- RFLP. *Annals Microbiology* 2010; 60 (2):189- 96.

(30) SoltanDallal MM., Salehipour Z., Mehrabadi ZF. Molecular pidemiology of *Staphylococcus aureus* in food samples based on the protein A gene polymorphic region DNA sequence. *Canadian Journal of Microbiology* 2010; 56 (1): 18- 21.

---

[1]- *Staphylococcus aureus*
[2]- Toxic Shock Syndrome
[3]- Hwang
[4]- Kwon
[5]- Baird Parker Agar
[6]- Difco
[7]- Blood Agar
[8]- VogesProskaver
[9]- Fermentas
[10]- Sambrook and Russell
[11]- Polymerase Chain Reaction
[12]- Rall
[13]- Eppendrof
[14]- Denaturation
[15]- Annealing of primers
[16]- Primer extension
[17]- Normanno
[18]- Reverse Passive Latex Agglutination
[19]- Soriano
[20]- Hazard Analysis and Critical Control Point
[21]- Good Manufacturing Practices
[22]- Bui
[23]- Gencay
[24]- Javadi and Safarmashaei
[25]- Feizi
[26]- Eshraghi
[27]- Omoe
[28]- Akinedon
[29]- Lim
[30]- Chiang
[31]- Pereira
[32]- SoltanDallal
[33]- Toxic Shock Syndrome Toxin
[34]- Good Agricultural Practices

Detection of enterotoxin genes of *staphylococcus aureus* isolates from chicken nugget in Esfahan province by PCR technique

Hajar Madahi
M.Sc Student of Food Science and Technology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, h.madahi@yahoo.com
Ebrahim Rahimi *
Associated Professor of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran, Ebrahimrahimi55@yahoo.com
Mohammad Jalali
Associated Professor of Infectious Disease and Tropical Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Iran, mjalali1343@gmail.com

Abstract

Introduction: The enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* is considered as one of the most common agents of food poisoning, gastroenteritis, diarrhea and vomiting that the presence of bacterial virulence genes can be as the most important cause of this foodborn illness. The present study was conducted to determine the presence of *S. aureus* and its virulence factors in chicken nugget and ready to eat foods in Iran.

Materials and methods: In summer 2012 a total of 420 samples chicken nuggets were collected from randomly selected retail stores in Isfahan provinces, Iran. Samples were cultured and the positive results were studied using PCR for detection of *sea-sej* virulence genes.

Results: Results showed that 24 of 420 samples (5.7 %) were found to be contaminated with *S. aureus*. Also 23 of 24 isolated *S. aureus* were positive for one or more entrotoxin genes. The most detected genes were *sea* (25 %), *sec* (12.5 %), *sed* + *sej* (4.16 %), *sed* + *seg* (4.16 %), *seg* + *sei* (4.16 %), *sea* + *seg* (8.33 %), *seb* + *sej* + *sei* (4.16 %), *sea* + *sed* (12.5 %), *sea* + *sec* + *sej* (12.5 %). The most commonly detected genes were *sea* and *sec*.

Discussion and conclusion: The chicken nugget can be easily contaminated by the *S. aureus* and usually this contamination causes Staphylococcal food poisoning. Therefore, some food safety and quality standards need to be applied and performed in most of food units to control prevalence of *S. aureus* and its virulence factors. Nowadays, consumption of fast foods like chicken nuggets is very popular. Therefore, it is important to study the prevalence of enterotoxigenic *S. aureus* and its virulence genes in chicken nugget that this shows the important public health issue.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Virulence genes, Chicken nugget, PCR

* Corresponding author
Received: November 2, 2013 / **Accepted:** January 15, 2014