المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (9) العدد (1)
لسنة 2017

الكشف عن السموم المعوية للمكورات العنقودية الذهبية في الحليب والجبن الطري المحلي في مدينة بغداد

أمل حسن فالح*[1] ، أ.د. محمد عمر محي الدين[2]

1. مختبر الصحة العام المركزي، وزارة الصحة، بغداد، العراق، farroha_biotec@yahoo.com .
2. قسم علوم الاغذية - كلية الزراعة – جامعة بغداد، mustco2003@yahoo.com .

تاريخ استلام البحث: 2017 /1/12 تاريخ قبول النشر: 2017/2/22

الخلاصة

هدفت الدراسة الى الكشف عن تلوث الحليب والجبن الطري المحلي بالمكورات العنقودية الذهبية ونوع السموم المعوية التي تفرزها في مثل هذه المنتجات، كونها احد المسببات الرئيسة للتسمم الغذائي المعروف بالتسمم الستافيلي، إذ تم جمع 120 عينة بواقع 76 عينة من الحليب و 44 عينة من الجبن الطري المحلي من مناطق مختلفة من محافظة بغداد واطرافها وتم الكشف عن السموم المعوية فيها باستعمال جهاز VIDAS Set 2، اذ لوحظ ان عينات الحليب الحاوية على السم المعوي A تشكل نسبة مقدارها 44.74%، في حين خلت من السموم الاخرى المتمثلة F, E, D, C, B. أما عينات الجبن فكانت هي الاخرى ملوثة بالسم المعوي A وحدها دون السموم الاخرى وبنسبة 54.50%، وجرى عزل 60 عزلة من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية من هذه العينات وشخصت بالفحوصات المظهرية والمجهرية و الكيمياوية– الحيوية باستعمال عدة API Staph، ثم جرى التحري عن جينات السموم المعوية E, D, C, B, A التي تحملها وبطريقة Multiplex PCR فوجد أن عدد العزلات التي تحتوي على جينات هذه السموم تبلغ 23 عزلة وان جين السم المعوي A اكثر انتشارا ترددا في العزلات وبنسبة 82.60%.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية الذهبية، السموم المعوية، جينات السموم المعوية التقليدية. PCR ، VIDAS.

DETECTION OF ENTEROTOXINS OF *Staphylococcus aureus* IN MILK AND LOCOLLY SOFT CHEESES IN BAGHDAD CITY

Amal Hasan Falih[1] ,D. Mohammed Omar Mujyaddin[2]

1. Central Health Laboratory year, the Ministry of Health , Baghdad, Iraq. farroha_biotec@yahoo.com .
2. Department of Food Science - College of Agriculture - University of Baghdad. baghdad.Iraq. mustco2003@yahoo.com.

Abstract

This study aimed to detect of contamination of milk and local soft cheese with *Staphylococcus aureus* and their enterotoxins with attempt to detect the enterotoxin genes in some isolates of this bacteria. A total of 120 samples, 76 of raw milk and 44 of soft cheese were collected from different markets of Baghdad city. Enterotoxins in these samples were detected by VIDAS Set 2 system and it was found that enterotoxin A is present in a rate of 44.74% in milk samples and in a rate 54.50% in cheese samples. While other enterotoxins B, C, D, E were not found in any rate in any samples.

Through the study 60 isolates obtained from milk and cheeses were identified as *Staphylococcus aureus* by cultural, morphological and biochemical test by using API Staph Kits. These isolates were subjected to find out which of the genes of classical enterotoxins A, B, C, D, and E were they harbored using Multiplex PCR assay. It was revealed that 23 isolates have one or more of these genes and the gene of enterotoxin A is more distributed among these isolates in a frequency of 82.60%.

Keywords: *Staphylococcus aureus, enterotoxins,* the genes of classical enterotoxins, PCR, VIDAS.

---

* البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول.

المقدمة

تعد المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* واحدة من أكثر انواع البكتريا أهمية في مجال صحة، وسلامة الاغذية وسلامتها، ذلك لأنها تسبب نوعا من التسمم الغذائي يعرف بالتسمم الستافيللي الذي يأتي في الترتيب الثاني بين حالات الامراض التي تنتقل عن طريق الغذاء في بعض دول العالم وبالترتيب الرابع على المستوى العالمي (**De Buyser *et al.*, 2001**)، تتميز هذه البكتريا بانها واسعة الانتشار في الطبيعة، فضلا عن تعاييشها بصورة طبيعية مع الانسان والحيوان. إذ يقدر عدد الحاملين لها على نحو دائم ما بين 20- 30% ولاسيما المتعاملين مع الاغذية، وتحديدا في تجويف الانف والجلد وتحت الابطين والسرة وغيرها. فهؤلاء، يشكلون أحد المصادر الرئيسة لتلوث الاغذية بها، الى جانب التلوث الناجم عن الهواء والتربة والماء (**Argudin *et al*, 2010**) وتعد الاغذية الغنية بالبروتينات كالحليب واللحم ومنتجاتهما، والبيض والمعجنات المغلفة بالكريم أكثر تعرضا للتلوث بها.

تمتلك بكتريا المكورات العنقودية الذهبية عددا كبيرا من عوامل الضراوة التي تزيد من قدرتها الامراضية، وهذه العوامل في معظمها ذات طبيعة بروتينية، منها انزيمية كانزيم التخثر Coagulase ومنها ما هي بروتينات ذات اوزان جزيئية واطئة تعرف بالسموم كتلك التي تعرف بالسموم المعوية التي تتميز بان لها قابلية الذوبان في الماء والمحاليل الملحية ومقاومة الحرارة والحموضة والانزيمات المحللة للبروتينات مثل الببسين والتربسين والكيموتربسين والرنين فضلا عن تحملها لمديات واسعة من الاس الهيدروجيني تتراوح من 1- 10 ولها اوزان جزيئية ما بين 22- 28 كيلو دالتون تقريباً، وعادة ما تسمى Staphylococcus Enterotoxins ويرمز لها بـ (SEs) حسب الحروف الابجدية بدءاً من الحرف A. وتعرف الستة الاولى منها (SEA to SEF) بالأنواع التقليدية لشيوعها وانتشارها ولأنها اول مجموعة تم التعرف عليها. وبعد ذلك تم اكتشاف انواع اخرى من السموم المعوية (**Kuroda *et al.*, 2001**) التي تفرزها هذه البكتريا عند نموها في وسط غني بالبروتينات والكربوهيدرات، لذلك يحتمل وجودها في جميع الاغذية التي تتعرض الى التلوث بها. وتؤثر في الانسان بكميات الضئيلة تقدر بالنانوغرام وتؤدي الى التسمم.

تشير الدراسات الوراثية الى أن الجينات المنتجة للسموم المعوية هذه البكتريا كامنة في البلازميدات والملتهمات الاولية، والعناصر القافزة والجزر الامراضية في كروموسوم البكتريا نفسها، عليه فان الانتقال الافقي لهذه الجينات وانتشارها بين سلالات هذه البكتريا يكون من الحالات المتوقعة (**Pinchuk *et al.*, 2010** و **Ángeles *et al.*, 2010**). وتشير الدراسات أن الجين المسؤول عن السم المعوي A أكثر انتشارا في المكورات العنقودية تليه الانواع الاخرى، لذلك فان معظم حالات التسمم الستافيللي تعود الى هذا السم.

لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى التعرف على واقع التلوث بالمكورات العنقودية الذهبية من خلال الكشف عن السموم المعوية الحليب الخام والجبن الطري المحلي والكشف عن الجينات المشفرة لهذه السموم في العزلات الملوثة لتلك المنتجات.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات:

جمعت 120 عينة من الحليب الخام والجبن المحلي الطري من مناطقة مختلفة من محافظة بغداد للفترة من تشرين الثاني حتى نيسان/ 2016، شملت مناطق الفضيلة، الصدرية، الكاظمية، الكريعات، الحسينية والراشدية. وبواقع 76 عينة من الحليب و 44 من الجبن. ونقلت الى مختبر الصحة المركز العام حيث اجريت الدراسة.

تقدير عدد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية:

اجريت التخافيف العشرية للعينات في المحلول الفسلجي بنقل 0.1 مللتر من التخافيف المناسبة الى وسط **Baird-Parker agar** الحاوي على 50 مللتر من صفار البيض و 6 مللتر من تلورايت البوتاسيوم **Potassium tellurite** بتركيز 2.8% جرى نشر التخافيف على سطح الوسط بوساطة قضيب زجاجي معكوف نشرا متجانسا ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م ولمدة 24 الى 48 ساعة، ثم حسب عدد المستعمرات التي تتميز بلونها الاسود والمحاطة بهالة شفافة نتيجة تحلل الليثيسين واستخرج منها عدد المكورات العنقودية الذهبية (وحدة تكوين المستعمرات– و.ت.م.) في غم أو مللتر واحد من العينة، تلاها نقل عدد من المستعمرات من كل عينة الى الوسط الزرعي المائل الصلب ونميت في درجة حرارة 37 م لمدة 24 الى 48 ساعة وحفظت في الثلاجة كعزلات للمراحل اللاحقة من الدراسة (**Luis *et al.*, 2004**).

تشخيص البكتريا:

شخصت العزلات مجهريا بعد تصبيغها بصبغة كرام للتعرف على استجابتها للصبغة وعلى شكل البكتريا وتجمعاتها. واجريت عليها فحص تخثر البلازما باستعمال بلازما دم الارانب، وفحص الكاتليز باستعمال بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3%، وفحص الاوكسيديز باستعمال N, N, N,- tetra methyl p- phenylene-

diaminedihydrochloride، وفحص تحلل الدم على وسط Blood base الصلب الحاوي على 5% (ح/ح) من دم الانسان، واكملت هذه الفحوصات بعدة API Staph المجهزة من شركة BioMerieux الفرنسية بعد تخفيف جزء من مستعمرات العزلات المنشطة وذلك في 5 مل من المحلول الفسلجي المجهز من الشركة نفسها **(Luis *et al.*, 2004)**.

الكشف عن سموم المكورات العنقودية الذهبية:

تم الكشف عن السموم المعوية E, D, C, B, A, للبكتريا في العينات قيد الدراسة باستعمال جهاز VIDAS Staph enterotoxins II SET 2، المجهزة من شركة BioMerieux الفرنسية. واتبعت طريقة العمل الموصى بها من قبل المجهز في تحضير العينات للفحص وفي اجراء الفحص نفسه، والتي تتلخص بنقل 25 مللتر من عينات الحليب الى دورق المخروطي وتعديل الاس الهيدروجيني إلى ما بين 3.5 الى 4 بأستعمال محلول حامض الهيدرو كلوريك بتركيز1 مولار، ثم المزج الجيد والنبذ المركزي لمدة 15 دقيقة بسرعة 2000 x g -3000 بدرجة حرارة 25 مْ بعدها أهمل الراسب ورفع الاس الهيدروجيني للرائق إلى 8 بأستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 5 مولار واخضع للنبذ المركزي ثانية وفقا للظروف المذكورة انفا ثم اهمل الراسب وحقن 0.5 مللتر من الرائق في الحفرة الأولى الخاصة بالعينة في شريط الفحص، اما بالنسبة لعينات الجبن فقد تم تحضيرها باضافة 40 مللتر من الماء المقطر المعقم الى 25 غم من العينة. ثم المزج في خلاط لحين تحوله الى مستحلب في درجة حرارة 38± 2م والحضن بدرجة حرارة 25 م لمدة 30 دقيقة تلاها تعديل الاس الهيدروجيني الى ما بين 3.5 الى 4، ثم اكمال خطوات التحضير كما ورد بالنسبة لعينات الحليب. وحقن 0.5 مللتر منه في شريط الفحص. وضع الشريط في جهاز VIDAS لقراءة النتائج التي تستغرق (80) دقيقة والتي يتم التعبير عنها على اساس (نانو غرام/ مللتر). علماً أن نسب تحسس الجهاز بالسموم هي كالاتي:

نوع السم	تركيز السم (نانو غرام/ مللتر أوغرام)			
	0.1	0.5	4	1
A	% 75	% 93	% 100	--
B	% 80	% 98	% 100	
C	--	% 84	% 95	% 100
D	--	% 48	% 82	% 95
E	--	% 66	% 93	% 100

الكشف عن الجينات المنتجة للسموم المعوية في عزلات المكورات العنقودية الذهبية:

استخلص DNA من 60 عزلة من عزلات البكتريا المشخصة باستعمال عدة مجهزة من شركة Geneaid وهي Presto Minig DNA Bacteria Kit والتي تحوي على المحاليل المنضمة والانزيمات اللازمة لعملية الاستخلاص والمتمثلة بانزيم اللايسوزايم لازالة طبقة الببتيدوكلايكان من جدار الخلية، وأنزيم بروتنيز K لتحليل البروتينات وازالتها، فضلا عن الكحول الاثيلي لترسيب DNA ومن ثم فصله وغسله وجمعه في انبوبة التجميع بعملية الترشيح، وتميزت الطريقة بكفاءتها العالية بدلالة نقاوة المستخلصات والتي تم قياسها في جهاز Nanodrop spectrophotometer وقدرت ما بين 1.52 الى 1.97 لعزلات الحليب ومابين 1.57 الى 1.91 لعزلات الجبن. تم تضخيم جينات السموم المعوية ب طريقة Multiplex PCR وباستعمال بواديء متعددة لجينات السموم E, D, C, B, A والمذكورة في الجدول أدناه وحضرت البواديء اعتمادا على ما ذكره **Sharma *et al.*, (2000)** ومن قبل الشركة Pioneer وجهزت بشكل مسحوق مجفد .lyophilized اذيب في حجم معين من الماء المقطر والمعقم بحسب توصيات المجهز وحفظت في(-20)مْ.

Primer name and size	Descriptions	N.S	Gene location	PCR product size
SA-U(20)	Universal forward primer	3́ -TGTATGTATGGAGGTGTAAC-5́	-	-
SA-A(18)	Reverse primer for *sea*	3́- ATTAACCGAAGGTTCTGT-5́	639-657	270
SA-B(18)	Reverse primer for *seb*	3́ – ATAGTGACGAGTTAGGTA-5́	564- 582	165
SA-C(20)	Reverse primer for *sec*	3́ – AAGTACATTTTGTAAGTTCC - 5́	457 – 477	69
ENT-C(25)	Reverse primer for *sec*	3́ – AATTGTGTTTCTTTTATTTTCATAA-5́	485 – 510	102
SA-D(20)	Reverse primer for *sed*	3́ – TTCGGGAAAATCACCCTTAA-5́	676- 696	306
SA-E(16)	Reverse primer for *see*	3́ – GCCAAAGCTGTCTGAG - 5́	584-600	213

وتضمن محلول تفاعل سلسلة البلمرة PCR على المواد المذكورة في الجدول أدناه، اذ أضيف اليه 7 مايكرو لتر من خليط البواديء و5 مايكرو لتر من DNA المستخلص وأكمل الحجم الى 20 مايكرو لتر بالماء المقطر المعقم ومزج جيداً.

Top DNA polymerase	1 U
Each dDNTP	250µM
Tris – HCl (pH:9.0)	10 mM
KCl	30 mM
Mgcl2	1.5 mM

اجري التفاعل في انابيب Apnedrufفي جهاز التضخيم Thermocycler اذ جرى رفع درجة حرارة التفاعل في البداية الى (94) م ولمدة (5) دقائق ثم اتبعت البرمجة الاتية لـ (25) دورة في عملية تضخيم الجينات.

1. درجة حرارة (94) م لمدة (30) ثانية لمسخ الدنا Denaturation.
2. درجة حرارة (50) م لمدة (30) ثانية لارتباط البادئ Annealing.
3. درجة حرارة (72) م لمدة (30) ثانية للاستطالة Extension.
4. درجة حرارة (72) م لمدة (10) دقائق للاستطالة النهائية Final extension.

سحب 10 مايكرولترمن نواتج التفاعل لتشخيص الجينات المضخمة بطريقة الترحيل الكهربائي حسب ما هو مذكور في **Sambrook and Russell, (2001)** باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 2% وأضيف إليه 5 مايكرولتر من صبغة بروميد الايثيديوم ثم حملت نواتج التضخيم لجينات السموم في حفر الهلام ورحلت بفولتية مقدارها 90 فولت ولمدة 40 دقيقة مع دلائل حجمية Ladder، جهزت من شركة Promega، هي 100-1500 pb DNA و 50-250 pb DNA وجرى تصوير الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية لإظهار الحزم وتم تحديد حجوم الحزم بالعودة الى حزم الدلائل، ومنها تم تحديد نوع جينات السموم.

النتائج والمناقشة

السموم المعوية في عينات الحليب الخام

يوضح (الجدول، 1) عدد عينات الحليب الخام الذي تم الكشف عن السموم المعوية فيها، موزعة على اساس محتواها من المكورات العنقودية الذهبية.

جدول (1): محتوى عينات الحليب الخام من المكورات العنقودية الذهبية ومن السموم المعوية مقدرة بطريقة VIDAS set2.

%	نوع السموم					للمكورات العنقودية الذهبية (عدد لوغاريتمي/ مل)	عدد العينات (76)
	E	D	C	B	A		
52.63	-	-	-	-	-	اقل من 3	40
2.63	-	-	-	-	+	اكثر من 3 أقل من 4	2
2.63	-	-	-	-	+	اكثر من 3 اقل من 4	2
3.93	-	-	-	-	+	اكثر من 4 أقل من 5	3
23.90	-	-	-	-	+	اكثر من 5 أقل من 6	18
13.15	-	-	-	-	+	اكثر من 6 أقل من 7	10
1.31	-	-	-	-	+	اكثر من 7	1
44.74					34	المجموع 76	

اذ يلاحظ أن جميع العينات التي كانت محتواها واطئة من هذه البكتريا لا يتجاوز عددها اللوغاريتمي عن 3 اي 10^3 و.ت.م/ مللتر تخلو من السموم المعوية بأنواعها الستة، وبلغ عدد هذه العينات 40 عينة، كما لوحظ أن عينتين من العينات الحاوية على عدد لوغاريتمي يتراوح بين اكثر من 3 واقل من 4 و. ت. م /مللتر من هذه البكتريا تخلو من السموم المعوية أيضاً.

على ان عينتين تحتوي على مثليهما من هذه البكتريا احتوت على السم المعوي A دون السموم الاخرى، فضلا عن ثلاث عينات كان العدد اللوغاريتمي لها أكثر من 4 واقل من 5. والواقع أنه لم يتم اكتشاف السموم المعوية الاخرى B و C و D و E في اي من العينات 74 التي اخضعت للفحص وبغض النظر عن عدد المكورات العنقودية الذهبية فيها.

ووجد أن العينات التي تحتوي على عدد لوغاريتمي 5 و. ت. م/مللتر أو أكثر من المكورات العنقودية الذهبية وتتضمن السم المعوي A، تمثل نسبة أكبر تشكل بمجملها 38.16%، وبذلك بلغ نسبة العينات الحاوية على السم المذكور من العينات الكلية 44.74% مقابل ما نسبته 55.26% خلت منه، ومن هذه النتائج يمكن الخروج بقناعة مفادها أن الحليب الذي يحتوي على المكورات العنقودية الذهبية بعدد لوغاريتمي أكثر من 3 وأقل من 4 يحتمل احتوائها على السموم المعوية، رغم ان المراجع العلمية تحدد هذا العدد بـ 5 واحياناً 6 كحد أدنى.

السموم المعوية في الجبن الطري المحلي:

يوضح (الجدول، 2) في عدد من عينات الجبن الطري المحلي قيد الدراسة عن وجود السموم المعوية فضلا عن عدد المكورات العنقودية الذهبية.

جدول (2): محتوى عينات الجبن الطري من المكورات العنقودية الذهبية وسمومها المعوية مقدرة بطريقةVIDAS set 2.

%	نوع السموم					المكورات العنقودية الذهبية (عدد لوغاريتمي/غم)	عدد العينات (44)
	E	D	C	B	A		
45.45	-	-	-	-	-	اقل من 3	20
4.54	-	-	-	-	+	اقل من 3	2
4.54	-	-	-	-	+	اكثرمن 3 اقل من 4	2
22.72	-	-	-	-	+	اكثرمن 4 اقل من 5	10
18.18	-	-	-	-	+	اكثرمن 5 اقل من 6	8
4.54	-	-	-	-	+	اكثرمن 6 اقل من 7	2
54.55	-	-	-	-	**24**	المجموع 44	

اذ يلاحظ من الجدول أن 20 عينة من أصل 44 عينة قد خلت من أي نوع من انواع السموم المعوية الخمسة التي تم التحري عنها. وكانت هذه العينات تحتوي على عدد ضئيل من المكورات العنقودية الذهبية والتي قدر بأقل من 3 كعدد لوغاريتمي/غم. بينما كانت هناك عينتان تحتويان على العدد نفسه من المكورات العنقودية وجد انهما يحتويان على السم المعوي A. كما كانت هناك عينتان ملوثتان بعدد لوغاريتمي أكثر من 3 واقل من 4/غم من البكتريا، وجد انهما يحتويان على هذا السم أيضاً، مما يعني أن وجود اعداد محدودة من البكتريا في عينة ما لا يلغي احتمال احتواء تلك العينة على السموم المعوية.

ويتبين من الجدول كذلك ان زيادة محتوى الاجبان الطرية من المكورات العنقودية الذهبية عن العدد اللوغاريتمي 4/ غم، تزيد من احتمالية تلوثها بالسموم المعوية. اذ بلغ عدد العينات التي احتوت هذا المستوى من التلوث 20 عينة. وبذلك قدر عدد العينات الحاوية على السم المعوي A بـ 24 عينة من أصل 44 عينة وبنسبة 54.55% مقابل 45.45% باب عدم الكشف عن بقية السموم في هذه العينات وعينات الحليب التي مر ذكرها، هو وجودها بتركيز دون التراكيز التي تتحسس بها الطريقة (لاحظ طريقة العمل).

تكاد الدراسات التي اولت اهتماماً للتحري عن السموم المعوية في الحليب ومنتجاته تُجمع ان السم المعوي A أكثر تواجدا وانتشارا (**Angeles *et al*., 2010** و **Pinchuk *et al*., 2010** و**Seo and Bohach, 2010**). وان هذا السم يعد مسؤولا عن 80% من حالات التسمم الستافيللي في الولايات المتحدة الامريكية أما السم المعوي B فتقع عليه مسؤولية((10%) (**Pinchuk *et al*., 2010**).

ويذكر ان **Brankica *et al*. (2012)** قام بالتحري عن السموم المعوية باستعمال ELISA kit Transia في 15 عينة بعض منتجات الالبان، فوجد أن السم موجود في عينة واحدة فقط. وانه يعود الى النوع A وبتركيز 1.56 نانوغرام/مللتر. أما **Tasci *et al*., (2011)** فقد اكتشف السموم المعوية Aو B وC في ثلاث عينات من منتجات الالبان من اصل 50عينة واشار الى أن هذه السموم قد وجدت في العينات التي تتراوح فيها العدد اللوغاريتمي للمكورات العنقودية الذهبية بين3.79 الى 6.21 / غم

وفي دراسة أخرى اجريت في اصفهان في ايران ايضاً، اخضع 72 عينة من الحليب الخام التي جرى جمعها من خزانات ستة معامل البان وبشكل عشوائي، للفحص عن سموم المكورات العنقودية الذهبية الستة من A الى E بطريقة ELISA فوجد انها موجودة في 15 عينة اي بنسبة 20.8% وموزعة على 3عينات تحتوي على السم A و6 عينات على السم D وعينتان على السم A & C و4 عينات تحتوي على السم A & D وعينة واحدة على السم C & D وعينتان تحتوي على ثلاثة سموم معوية في أن واحد وهي A & C & D ووجد أن السم المعوي A أكثر تردداً من السموم الاخرى، إذ لوحظ وجوده في 12 عينة اي بنسبة 16.7% (**Rahimi *et al*., 2013**).

الكشف عن الجينات المشفرة عن السموم المعوية في المكورات العنقودية الذهبية.

يوضح (الجدول، 3)، ويتبين أن العزلات التي اعتمدت في الدراسة كانت موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الاوكسيديز ومختزلة للنترات ومخمرة للما نتول.

جدول (3): خواص عزلات المكورات العنقودية الذهبية المزرعية والمظهرية والتي استعملت في الدراسة للكشف جينات السموم المعوية فيها.

الوسط او الفحص	الخصائص
Baird-Parker Egg Yolk Tellurite Medium	مستعمرات سوداء، محدبة ، محاطة بهالة ناتجة عن تحلل الليثيسين
Blood agar	تكون تحلل منطقة شفافة حول المستعمرات
استجابتها لصبغة كرام	موجبة
تجمعات الخلايا تحت المجهر	عنقودية مع وجود خلايا ثنائية او مفردة متفرقة
فحص الكاتليز	موجب
فحص الاوكسيديز	سالب
فحص التخثر	موجب
اختزال النترات (بفحص API)	موجب
تخمر المانتول (بفحص API)	موجب

وامعاناً في تشخيص العزلات فقد اخضعت لمجموعة من الفحوصات الكيمياوية – الحيوية التي اجريت باستعمال نظام API Staph، فجاءت النتائج مؤكدة على عائديه العزلات المنتخبة الى بكتريا *S. aureus* (النتائج غير مذكورة في هذا البحث)، وجرى التحري عن جينات السموم المعوية في هذه العزلات وحسب الالية المذكورة تفاصيلها في طريقة العمل.

جينات السموم المعوية في عزلات الحليب الخام:

يلاحظ من (الجدول، 4) انه من أصل 36 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الحليب فان 13 عزلة خلت من الجينات الخمسة التي تم التحري عنها وبنسبة تشكل 36.11% من مجمل العزلات، مقابل 23 عزلة احتوت على جينات متباينة وبنسبة 63.83%. ولوحظ أن الجين الذي يشفر للسم المعوي A أكثر انتشاراً بين العزلات إذ وجد في 19 عزلة وبنسبة 82.60%، إما لوحدها او مع غيرها من جينات السموم المعوية. يليه الجين B بنسبة 17.39% ثم C بنسبة 17.39% ثم D و E وبنسبة انتشار بلغت 8.69% لكل منها.

جدول (4): جينات السموم المعوية التي تم الكشف عنها في عزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الحليب الخام.

العزلات (36)	جينات السموم المعوية					%
	A	B	C	D	E	
13	-	-	-	-	-	36.11
15	+	-	-	-	-	41.66
2	+	+	-	-	-	5.55
1	-	-	+	-	-	2.77
1	+	-	+	-	-	2.77
1	+	-	-	+	+	2.77
1	-	-	+	+	+	2.77
1	-	+	+	-	-	2.77
1	-	+	-	-	-	2.77
عدد العزلات المشفرة لكل جين	19	4	4	2	2	63.83
% من العزلات المشفرة الكلية	82.60	17.39	17.39	8.69	8.69	/

يوضح (الجدول، 5) عدد العزلات في ضوء عدد جينات السموم المعوية التي تحملها، إذ يلاحظ أن هناك (17) عزلة تحمل جيناً واحدا فقط وهو إما A أو B أو C. وإن ثمة اربع عزلات تحمل جينين فقط من الجينات الخمسة التي تم التحري عنها وهي إما AB أو AC أو BC. أما عدد العزلات التي وجد انها تحمل ثلاثة جينات فكانت عزلتان والجينات هي أما ADE أو CDE. ولم يتم الكشف عن اربع جينات مختلفة في اية عزلة من العزلات البالغ عددها (36) عزلة في آن واحد.

الجدول (5): توزيع الجينات على عزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الحليب.

عدد العزلات	عدد الجينات في العزلة	نوع الجين وعدد مرات تكراره
13	لا يوجد	-
17	1	إما A (15) أو B (1) أو C (1)
4	2	AB (2) أو AC (1) أو BC (1)
2	3	ADE(1) أو CDE (1)
-	4	-

جينات السموم المعوية في عزلات الجبن الطري:

يوضح (الجدول، 6) جينات السموم المعوية التي تم الكشف عنها في عزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من عينات الجبن الطري البالغ عددها 24 عزلة، إذ يلاحظ أن 10 عزلات منها قد خلت من الجينات الخمسة المتمثلة بـ A و B و C و D و E مقابل 14 عزلة احتوت على جين أو أكثر من تلك الجينات وبنسبة بلغت 54.31%. وكانت 6 عزلات منها تحتوي على جين A لوحده، شكلت 25.00% من مجمل العزلات مقابل 3 عزلات احتوت على جين أخر هو C لوحده وعزلة واحدة احتوت على جين E دون الجينات الاخرى. كما يلاحظ أن جين A أكثر انتشاراً في هذه العزلات، إذ وجد في 8 عزلات وبنسبة 57.14% من العزلات الحاملة للسموم المعوية، يليها الجين C الذي وجد في 7 عزلات 50%. أما الجينات B و D و E فقد وجدت في عزلة واحدة.

كما يلاحظ ايضا من (الجدول، 7) أن العزلات التي تحمل أكثر من جين واحد لا يتجاوز 4 عزلات. وهذا العدد يقتصر على جينين فقط وهما أما AC (عزلتين) أو BC (عزلة واحدة) أو CD (عزلة واحدة) كما هو موضح في (الجدول، 7) الذي يوضح ايضاً انه ليست ثمة عزلة من عزلا ت الجبن كانت حاملة لأكثر من جينين.

جدول (6): جينات السموم المعوية التي تم الكشف عنها في عزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الجبن المحلي.

العزلات (24)	**السموم المعوية**					**%**
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	
10	-	-	-	-	-	41.65
6	+	-	-	-	-	25.00
3	-	-	+	-	-	12.50
2	+	-	+	-	-	8.33
1	-	+	+	-	-	4.16
1	-	-	+	+	-	4.16
1	-	-	-	-	+	4.16
عدد العزلات المشفرة لكل جين	8	1	7	1	1	58.31
% من العزلات المشفرة الكلية	57.14	7.14	50	7.14	7.14	-

جدول (7): توزيع الجينات على عزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الجبن.

عدد العزلات	**عدد الجينات في العزلة**	**نوع الجين وعدد مرات تكراره**
10	لا يوجد	-
10	1	إما A (6) أو C (3) أو E (1)
4	2	أما AC (2) أو BC (1) أو CD (1)
-	3	-

وتتفق هذه النتائج في معظم جوانبها مع الدراسات التي اهتمت بالتحري عن جينات السموم المعوية في المكورات العنقودية الذهبية. فجميع تلك الدراسات تؤكد ان جين السم المعوي A أكثر تكرارا في المكورات العنقودية الذهبية وان السم نفسه أكثر انتشارا في الاغذية ولاسيما منتجات الالبان **(Al-Khafaji, 2013)** وجاءت النتائج التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة متوافقة مع تلك التأكيدات، إذ كانت نسبة تواجد السم A في عينات الحليب والجبن أكبر بكثير من نسبة تواجد السموم الاخرى، وان نسبة تكرار الجين الذي يشفر لهذا السم في المكورات العنقودية التي تم عزلها من تلك العينات كانت 52.77% في عزلات الحليب 33.33% في عزلات الجبن.

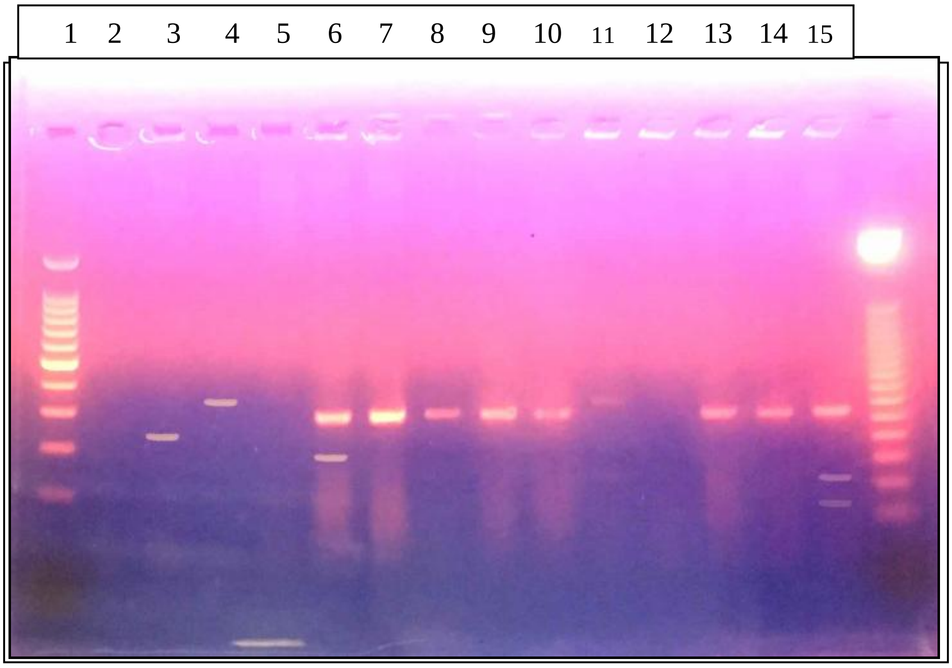
وقد وجد **Bendahou *et al.*, (2009)** ان 39% من عزلات المكورات العنقودية الذهبية الموجبة لفحص التخثر، تفرز السموم المعوية التي تم الكشف عنها ب طريقة Reversed passive latex agglutination (RPLA) وكانت 56.5% من هذه العزلات تحمل جينات السموم المعوية والتي تم التعرف عليها بطريقة PCR، وكان الجين المنتج للسم A أكثر ترددا من الجينات الاخرى، وفقد وجد في 46 عزلة من المكورات العنقودية عزلت من 81عينة اشتملت على الحليب الخام والجبن واللبن في المغرب. ويذكر الباحث أن المكورات العنقودية الذهبية مسؤولة عن 37 من حالات التسمم الغذائي الذي تظهر في المغرب.

وقام الباحث **Chapaval *et al.*, (2006)** بعزل 132 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية من الحليب الخام (غير المعامل حرارياً) في مدينة ساو باولو البرازيلية واجرى كشفاً عن الجينات المعوية التقليدية التي تحملها الى جانب جين متلازمة الصدمة السمية TSST-1 وبطريقة PCR واستعمل ستة أزواج من البوادئ ذات علاقة بهذه الجينات فوجد ان 68.18% منها تحتوي على جين واحد على الاقل من جينات السموم المعوية وان عزلتان فقط تحتويان على جين أنتاج سم متلازمة الصدمة السمية، وفي البحث الذي انجزته **Al-Khafaji (2013)** من خلال دراسة 200 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الحليب الخام والمبستر والمكثف والمبخر ومن الاجبان الطرية والمملحة والجافة وشبه جافة،

وجد أن 95 عينة منها وبواقع 62.09% منها تحمل جيناً أو اكثر من جينات السموم المعوية. وان الجين المسؤول عن انتاج السم المعوي A أكثر ترددا في هذه العزلات إذ شكلت 51.85% من مجمل الجينات الاربعة التي جرى التحري عنها وهي جينات السموم المعوية A و B و C وD يتبعه الجين D وبنسبة 34.73% ومن ثم الجين B فالجين C ونسبة 12.50% و 0.92% على التوالي. واوضحت الدراسة ايضاً أن 66.66% من العزلات تحمل جيناً واحد و 25.50% تحمل جينين 7.80% تحمل ثلاثة جينات. على ان الدراسة التي اجراها **Khudor *et al.*, (2012)** في البصرة على 57 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية عزلت من 200 عينة من حليب الابقار والجاموس وبواقع 30 عزلة من الاول و27 من الثاني، فوجد ان نسبة البكتريا المنتجة للسموم المعوية لعزلات حليب الابقار تبلغ 30% وبواقع 9 عزلات ولعزلات حليب الجاموس 18.5% وبواقع 5 عزلات وان نوع الجين الذي تم الكشف عنه في جميع هذه العزلات كان جين السم المعوي C دون الجينات الاخرى.

وفي دراسة اجراها **Kérouanton *et al.*, (2007)** على 178 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية الموجبة لفحص التخثر التي تم الحصول عليها من 31 حالة تسمم ستافيللي في فرنسا، تحرى فيها عن الجينات المسؤولة عن انتاج السموم المعوية في (33 عزلة فوجد انها موجودة في 29 عزلة أما بواقع جين واحد أو اكثر، وكان الجين A هو السائد، إذ وجد في 23 عزلة يليه الجين D في 12 عزلة فالجين H في 5 عزلات فقط.

وتشير دراسة **(Rolla *et al.*, 2016)** التي اجريت على 122 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية التي جمعت من الحليب ومن مراحل مختلفة لصناعة الجبن فلوحظ أن 55 من هذه العزلات تحتوي على الجينات المنتجة للسموم وان 26 عزلة كانت حاوية على الجينات المسؤولة عن انتاج ثلاثة سموم في أن واحد وهي D و J و R بينما كان الجين المسؤول عن انتاج السم المعوي A موجودا في عزلة واحدة فقط. يوضح (الشكل، 1) نتائج الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز لعدد من جينات السموم المعوية من المكورات العنقودية الذهبية.



شكل (4-8): الترحيل الهلامي الكهربائي بهلام الاكاروز لعدد من جينات السموم المعوية من المكورات العنقودية اذ يمثل:
1. و 16 يمثل دنا باوزان جزيئية قياسية 2. -control - بدون نموذج 3. عزلة (59) جين السم C 4. عزلة (60) جين السم D 5 و12 عزلة (3 و30) خالية من الجينات المنتجة للسموم 6- عزلة (28) جين السم A و B من 7-10 عزلات تحتوي على للسم A فقط و 15-عزلة (25) جين السم A و C

المصادر

Al- khafaji, M. H. (2013). Detection of Enterotoxins Genes in Staphylococci Isolated from Milk and Cheese. Ph. D. Thesis. College of Science. Baghdad University.

Ángeles, M. A.; Mendoza, M. C., Rodicio MR. (2010). Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *J. Toxins.* 2(7):1751–1773.

Chapaval, L; Moon, D. H; Gomes, J. E; Duarte, F. R. and Tsair, S. M. (2006). use of PCR to detect classical enterotoxins genes (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (*tst*) in *staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *s. aureus.* Arg inst.Biol. *J. Sao Paulo; gol* 37, (2): 65-196.

De Buyser , M. L.; Dufour, B.; Maire, M. and Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. *International Journal of Food Microbiology*, 67 (1–2): 1–17.

De Buyser, M.L.; Dufour, B. Maire, M., Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in diff erent industrialized countries Int. *J. Food Microbiol*ogy. 67: 1-17.

Kérouanton, A.; Hennekinne, J. A.; Letertre, C.; Petit, L.; Chesneau, O.; Brisabois, A.; and De Buyser, M. L. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiology.* 115: 369–375.

Khudor, M. H.; Abbas, B. A. and Idbeis, H. I. (2012). Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk. Bas. *J. Vet. Res*.11 (1).

Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H. and Kobayashi, I. (2001). Whole genome sequencing of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Lancet* 357: 1225-1240.

Luis, M. D.; Marie, T. P.; Janet, T. S; Ellena, M. P. (2004*). Color Atlas of Medical Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington.

Pinchuk, I. V.; Beswick, E. J. and Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal Enterotoxins. *J. Toxins*. 2: 2177-2197.

Rahimi, E; Mommtaz, H; Shakerian, a; Kavyan, H. R. (2012). The detection of classical enterotoxins of S. *aureus* in row cow milk using the ELESA method. *J. Turk/vet Animsci.* 36 (3): 19-22.

Rolla, J. G.; Czubkowska, A; Korpysa-Dzirba, W. and Osek, J. (2016). Occurrence of Staphylococcus aureus on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland. *J. Toxins.* 8 (62): 2-9.

Sharma, N. K.; Ees, C. E. D and Odd, C. E. R. (2000). Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for Staphylococcus aureus strains. *J. Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1347-1353.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor, New York USA.

Seo, K. S. and. Bohach, G. A. (2010). Staphylococcal Food Poisoning, in ``Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions. Edited by V. K. Juneja and J. N. Sofos. 2010 ASM Press, Washington, DC. *Staphylococcus aureus* Isolates from the Bronx, New York. *Appl. Environ. Microbiol.,75,* 6839–6849.

Tasci, F.; Sahindokuyucu, F. and Ozturk, D. (2011). Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province. *J. African Journal of Agricultural Research*. 6(4): 937-942.

Brankica, L; Vesna, J; Vesna, Đ; Branka, B.; Velebit, B and Mitrović, R. (2012). Determination of Staphylococcal enterotoxins in cheese by immunoenzyme assays. *J. Arch. Biol. Sci., Belgrade*. 64 (4): 1449 -1454.

Bendahou, A.; Abid, M.; Bouteldoun, N.; Catelejine, D. and Lebbadi, M. (2009). Enterotoxigenic coagulase positive Staphylococcus in milk and milk products, lben and jben, in northern Morocco. *J. Infect Developing Countries*. 3(3):169-176.