نقش انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس (SEs) در مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی: مقاله مروری سیستماتیک

• داریوش عسگرپور
دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
d.asgarpoor@zums.ac.ir

• دکتر حبیب ضیغمی
استادیار باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
zeighami@zums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از شایع ترین علل مسمومیت‌های غذایی در بسیاری از کشورها شناخته شده است. این باکتری دارای توکسین‌های متعددی است که در بین آن‌ها انتروتوکسین از اهمیت بالاتری برخوردار بوده و مصرف غذاهای آلوده به این توکسین باعث ایجاد مسمومیت غذایی می‌شود. انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs) پروتئین‌های خارج سلولی تک زنجیری با وزن مولکولی پائین (۲۹-۲۲ کیلو دالتون) می‌باشند که از نظر فعالیت بیولوژیکی مشابه هم بوده ولی از نظر آنتی ژنی با هم تفاوت دارند. این توکسین ها ۲۳ نوع مختلف دارند که باعث ایجاد تهوع، استفراغ، اسهال، دردهای عضلانی و شکمی و گاهی نیز منجر به مرگ می‌شوند. هدف از این مطالعه، مروری بر نقش و اهمیت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در مسمومیت غذایی، پاتوژنز، روش‌های آزمایشگاهی تخلیص و تشخیص این توکسین‌ها در مواد غذایی می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه از نوع Systematic Review بوده که به جمع آوری اطلاعات با استفاده از پایگاه‌های اطلاعات متعدد مانند PubMed، Scopus، Science Direct، پایگاه اطلاعات علمی SID و IRAN MEDEX پرداخته است. بدین منظور تعداد ۵ کلید واژه

Staphylococcal Enterotoxins
Staphylococcal food poisoning
Food borne diseases
structure of Staphylococcal Enterotoxins
Detection of Staphylococcal Enterotoxins

برای جمع آوری اطلاعات از پایگاه‌های مذکور استفاده شد. بازه زمانی برای مطالعه، بین سال‌های ۱۹۶۷ تا ۲۰۱۴ در پایگاه داده‌ها انجام شد. معیار ورود در انتخاب مقالات این بود که کلید واژگان فوق در مقالات ذکر شده باشد. در نهایت تعداد ۴۰ مقاله برای استخراج داده‌ها و جمع آوری اطلاعات از پایگاه‌های علمی مذکور مورد بررسی قرار گرفتند.

بحث و نتیجه گیری: استافیلوکوکوس اورئوس در طیف وسیعی از درجه حرارت و pH رشد می‌کند لذا ممکن است در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی حضور داشته و رشد نماید. همچنین مواد غذایی که با سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین آلوده شده باشند، اگر در شرایط نامناسب سرد خانه‌گذاری شوند، می‌تواند منبع شیوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی واقع گردند. بنابراین لزوم همکاری اپیدمیولوژیست ها، میکروبیولوژیست ها، کارشناسان دامپزشکی و بهداشت مواد غذایی با همدیگر به منظور کاهش مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی که ناشی از خوردن انتروتوکسین این باکتری ایجاد می‌گردد، یک پیش نیاز برای تحقق سلامت عمومی است.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس (SEs)، مسمومیت غذایی استافیلوکوکی (SFP)، مقاله مروری سیستماتیک

مقدمه

هر ساله صدها هزار نفر از مردم دچار مسمومیت غذایی می‌شوند که یکی از مهم ترین عوامل ایجادکننده آن، استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد [۱]. ابتلا به مسمومیت غذایی در اثر خوردن غذای حاوی انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت که معمولا توسط استافیلوکوکوس اورئوس تولید می‌شود، بروز می‌کند. انتروتوکسین‌ها در انواع مواد غذایی از قبیل گوشت خام، سبزیجات، محصولات لبنی و غیره در ارتباط با مسمومیت غذایی بوده و میزان باکتری لازم برای ایجاد مسمومیت غذایی ناشی از انتروتوکسین ها، 10^{5}-10^{8} cfu گزارش شده است. هر چند استافیلوکوکوس اورئوس را می‌توان با پاستوریزاسیون از بین برد ولی انتروتوکسین‌های این باکتری به دمای پاستوریزاسیون مقاوم هستند. از طرفی مقاومت حرارتی این توکسین‌ها در درون ماده غذایی بیشتر از محیط‌های کشت آزمایشگاهی است لذا بعد از مراحل گرمایی آماده سازی غذا همچنان فعالیت بیولوژیکی خود را حفظ می‌کنند و باعث بروز مسمومیت غذایی می‌شوند [۲-٤].

استافیلوکوکوس‌ها متعلق به خانواده میکروکوکاسه می‌باشند. این باکتری‌ها گرم مثبت، فاقد حرکت، بدون اسپور، هوازی و بی هوازی اختیاری اند [٥]. از بین استافیلوکوکوس‌ها، استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین علل مسمومیت‌های غذایی در بسیاری از کشورها است [٤]. این باکتری دارای توکسین‌های متعددی می‌باشد که به طور مثال می‌توان به لکوسیدین، همولیزین و انتروتوکسین اشاره کرد که در بین آن‌ها انتروتوکسین از اهمیت بالاتری برخوردار بوده و مصرف غذاهای آلوده به این توکسین باعث ایجاد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌شود [٤, ٦].

انتروتوکسین‌ها پروتئین‌های محلول در آبی هستند که توسط سلول باکتری ترشح می‌شوند و به عنوان عامل استفراغ در مسمویت‌های غذایی و گاستروآنتریت‌ها مطرح می‌باشند. انتروتوکسین ها از جمله سوپر آنتی ژن‌های مهم باکتریایی محسوب می‌شوند. سوپر آنتی ژن‌های باکتریایی تکثیر سلول‌های T را تحریک می‌کنند و مولکول‌هایی هستند که به رسپتور Vβ موجود در سلول‌های T (TCR) متصل شده و در کنار مولکول MHC-II عرضه شده و باعث آزادسازی مقادیر زیادی سایتوکاین‌های مربوط به Th1 (IL-2، TNF و INF-γ) می‌شوند [۷, ۸]. وجود انتروتوکسین به میزان خیلی کم، در حد ۲۰ نانوگرم تا ۱ میکروگرم بسته به نوع انتروتوکسین می‌تواند موجب ایجاد علائم مسمومیت غذایی شود؛ به طوری که اگر تعداد 10^{5} باکتری در هر گرم ماده غذایی وجود داشته باشد، باکتری می‌تواند انتروتوکسین تولید کند و حتی اگر در صورت حرارت باکتری از بین رفته باشد، به دلیل مقاومت انتروتوکسین به حرارت، توکسین فعال باقی مانده و باعث بروز مسمومیت غذایی می‌شود که این امر معمولا در مراکز زندگی جمعی و عمومی می‌تواند منجر به بروز اپیدمی شود [٤, ۹].

استافیلوکوکوس اورئوس در ۲۰ تا ۳۰٪ از جمعیت انسانی به صورت پایدار و در ٦۰٪ افراد به صورت متناوب یافت می‌شود لذا افرادی که در مراکز تهیه، عمل آوری و پخش مواد غذایی فعالیت می‌کنند در صورت عدم رعایت نکات بهداشتی می‌توانند باکتری را به غذا منتقل کنند [۱۰, ۱۱]. بنابراین بیماری‌های منتقله از غذا یک معضل اساسی سلامت و بهداشت عمومی محسوب می‌گردد که سالانه با صرف هزینه‌های چند بیلیون دلاری، میلیون‌ها نفر از جمعیت جهان بدان مبتلا و بخشی نیز دچار مرگ و یا بستری شدن در بیمارستان‌ها می‌شوند. باکتری استافیلوکوکوس به عنوان دومین علت مهم این بیماری ها معرفی شده است. مسمومیت غذایی این باکتری که به علت حضور سویه‌های انتروتوکسیژنیک آن در غذاها و هضم آن ایجاد می‌شود، بر خلاف مسیر آرام خود خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای ایجاد می‌کند[۱۲] . با توجه به بررسی‌های انجام شده در موتورهای جستجوگر مشخص گردید که در زمینه انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در کشور ایران مطالعات خیلی کمی صورت گرفته است. همچنین با توجه به اهمیت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس و نقش آن‌ها در بهداشت و سلامت جامعه، ضرورت آشنایی با خصوصیات و ویژگی ها، کنترل و ردیابی این انتروتوکسین‌ها از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. بنابراین مطالعه حاضر با هدف آشنایی با خصوصیت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اهمیت آن‌ها در مسمومیت غذایی

و روش‌های آزمایشگاهی تخلیص و تشخیص آن‌ها صورت گرفت.

Staphylococcal Enterotoxins (SEs) و طبقه بندی آن‌ها

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs) پروتئین‌های خارج سلولی با وزن مولکولی ۲۹ـ۲۲ کیلو دالتون می‌باشند که از نظر ترکیب و فعالیت بیولوژیکی مشابه هم بوده ولی از نظر آنتی ژنی با هم تفاوت دارند [۳, ۱۳, ۱٤].

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs) بر مبنای خصوصیات بیولوژیکی و سرولوژیکی به ۲۳ نوع مختلف طبقه بندی می‌شوند [۱٤, ۱۵]. دسته اول انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی هستند که عبارتند از SEA، SEB، SEC، SED و SEE که SEC خود به سه زیرگروه SEC1، SEC2 و SEC3 تقسیم می‌شود [۳]. بیش از ۹۵٪ از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس که مسمومیت غذایی ایجاد می‌کنند، جزء سروتیپ گروه انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی هستند [۳, ۱٦].

دسته دوم، انتروتوکسین‌های نو ظهور استافیلوکوکی هستند که شامل SEG، SEH، SEI، SEIJ، SEIK، SEIL، SEIM، SEIN، SEIO، SEIP، SEIQ، SEIR، SEIU، SEIV و SEIX می‌باشد. این انتروتوکسین‌ها به ترتیب توسط ژن‌های sea، seb، sec، sed، see، seg، seh، sei، sej، sek، sel، sem، sen، seo و... کد می‌شوند. از میان انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی انواع SEA تا SEE که نسبت به حرارت و آنزیم‌های پروتئولیتیکی دستگاه گوارش مثل پپسین و تریپسین مقاومت بیشتری دارند، موجب بروز مسمومیت غذایی استافیلوکوکی می‌گردند [٤, ۱۷].

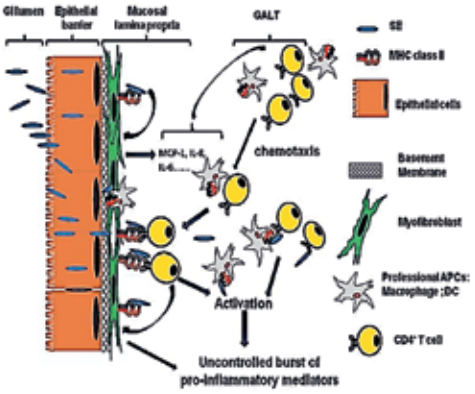
آسیب التهابی دستگاه گوارش (GI) توسط انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس

مطالعات اولیه در مورد آسیب التهابی GI که در ارتباط با انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs) ایجاد می‌شد، در مدل‌های حیوانی میمون و سگ از سال‌های ۱۹٦۰ تا ۱۹۷۰ صورت گرفت [۱۸]. بعدها مشخص شد که عامل اسهال و استفراغ ناشی از مسمومیت‌های غذایی خوردن انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی بوده است. این علائم در عرض چند ساعت پس از خوردن مواد غذایی آلوده به SE رخ می‌دهد. مسمومیت ناشی از خوردن انتروتوکسین منجر به التهاب در سراسر دستگاه گوارش با ضایعات شدید در ژژنوم و ایلئوم می‌شود [۱۸-۲۰]. مطالعات نشان می‌دهد مصرف خوراکی SEA در خوک باعث افزایش لنفوسیت ها و سلول‌های پلی مورفونوکلئار (Polymorphonuclear cells) در ناحیه ژژنوم و دئودنوم شده و منجر به ایجاد استفراغ سریع و پاسخ‌های رفتاری عصبی (Neurobehavioral responses) می‌گردد؛ این نشان می‌دهد که روده یک سایت هدف برای SEA است [۲۰]. دادن یک دوز از SEB به میمون رزوس باعث ایجاد ضایعه در سلول‌های اپیتلیال در ناحیه پرزهای روده و Lamina propria در ژنوم می‌شود [۲۱].

در زیر به مدلی از آسیب التهابی دستگاه گوارش (GI) ناشی از SEs اشاره می‌کنیم (شکل ۱).

آسیب التهابی دستگاه گوارش که ناشی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی (SEs) صورت می‌گیرد معمولا در اثر فعالیت سوپر آنتی ژنی SEها بوده که بر روی مولکول MHC-II متصل و در بیان سلول‌های مخاطی از قبیل ماکروفاژها و سلول‌های دندریتی (DC) و همچنین میوفیبروبلاست نقش دارد. SEsها در حضور Antigen presenting cells (APCs) APCs و TCRها باعث تحریک سلول‌های T و $CD4^+$ می‌شوند. SE می‌تواند از سد اپیتلیالی روده (Intestinal epithelial barrier) عبور کرده بدون این که فعالیت تخریبی بر روی آن داشته باشد و در ناحیه زیر سد اپیتلیالی با اتصال به مولکول MHC-II باعث بیان میوفیبروبلاست در این ناحیه می‌شود. این فرآیند باعث تولید سایتوکائین‌های پیش التهابی و کموکائین‌ها می‌شود که از این میان می‌توان به IL-6، IL-8 و MCP-1 (Monocyte chemotactic protein1) اشاره کرد که منجر به افزایش فعالیت سلول‌های ایمنی از قبیل $CD4^+$، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتی در ناحیه بافت لنفاوی روده (GALT (gut associated lymphoid tissue می‌شود. در نهایت وقتی مولکول MHC-II، SEs و TCR در کنار هم به صورت MHC-II:SEs:TCR قرار گرفته باعث تحریک و تولید کنترل نشده سلول‌های T و در نهایت تولید بیش از حد سایتوکاین‌های پیش التهابی و کموکاین‌ها

شده و باعث ایجاد التهاب و شوک می‌شود [۲۲].



شکل ۱: مدلی از آسیب التهابی دستگاه گوارش(GI) ناشی از انتروتوکسین استافیلوکوکی

با وجود پیشرفت‌های قابل توجهی از درک چگونگی ایجاد التهاب دستگاه گوارش توسط انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، هنوز چگونگی ایجاد این التهاب در شرایط In vivo و نقش دقیق سلول‌های ایمنی و سلول‌های غیر ایمنی در پیشرفت این بیماری کاملا مشخص نیست. ولی بیشتر مطالعات آزمایشگاهی هم در شرایط In vitro و هم In vivo نشان می‌دهند که آسیب‌های التهابی دستگاه گوارش ناشی از استافیلوکوک انتروتوکسیژنیک مربوط به فعالیت سوپر آنتی ژنیسیته SEsها است که با اتصال به مولکول MHC–II و بیان سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (APCs) باعث فعال شدن سلول‌های T نوع $CD4^+$ می‌شود که این‌ها گیرنده‌های عمده انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی می‌باشند. این میان کنش ها نهایتا منجر به فعالیت بالای APCs و سلول‌های T شده و پرولیفراسیون (Proliferation) $CD4^+$ اتفاق افتاده و در نهایت انتشار سایتوکائین‌های پیش التهابی و کموکائین ها منجر به اثر SE و کمک به ایجاد التهاب در دستگاه گوارش می‌شود [۲۲].

مسیرها و مکانیسم‌های استفراغ زایی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس (SEs)

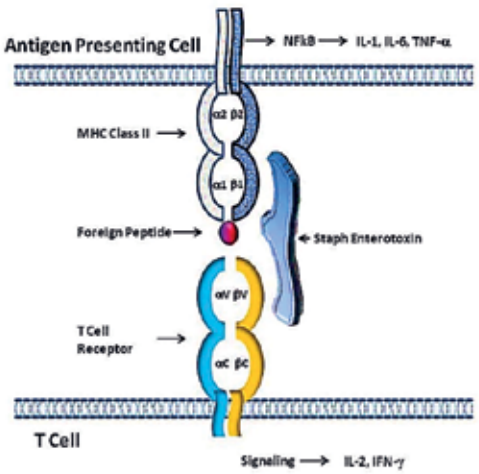
اگرچه فعالیت سوپرآنتی ژنی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس به خوبی شناخته شده است، ولی درک ضعیفی از مکانیسم استفراغ زایی آن‌ها وجود دارد. یکی از این دلایل کمبود مدل‌های حیوانی برای مطالعات اثر استفراغ زایی SEsها است. با این وجود پستانداران غیر از انسان، گزینه مناسبی برای مطالعات اثرات استفراغی SEsها محسوب می‌شوند. پستانداران کوچک با تزریق داخل صفاقی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی در عرض ۲ ساعت دچار استفراغ می‌شوند [۲۳].

مطالعات انجام یافته نشان می‌دهد که سایت هدف انتروتوکسین SEA به منظور استفراغ زایی، روده کوچک می‌باشد و استفراغ زایی توسط این انتروتوکسین از طریق مسیر 5-Hydroxytryptamine (5-HT) یا Serotonin pathway انجام می‌گیرد. سروتونین یک مدیاتور سیگنالینگ (Signaling mediator) مهم دستگاه گوارش می‌باشد که باعث فعال شدن سلول‌های عصبی روده شده و همچنین با تحریک پاسخ‌های عضلانی روده باعث افزایش ترشح می‌شود [۲٤]. اخیرا مطالعه ای انجام شده که نشان می‌دهد Aspartic acid موجود در ناحیه ۲۲۷ از SEA فعالیت مهمی را در استفراغ زایی این انتروتوکسین دارد؛ به طوری که با جایگزینی اسید آمینه آلانین در این ناحیه از SEA، فعالیت استفراغ زایی آن از بین می‌رود [۲۵].

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی ایجاد کننده اسهال و ایمنوپاتوژنز آن‌ها

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی از قسمت حفره یا شیار اتصالی پپتید (Peptide binding groove) در ناحیه خارجی سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (APCs) به مولکول MHC–II متصل می‌شوند (شکل ۲). جهش در MHC–II و یا خود انتروتوکسین روند اتصال را مختل می‌کند. SEA دارای دو سایت اتصالی به مولکول MHC–II می‌باشد. این انتروتوکسین برای این که فعالیت بهینه‌ای داشته باشد باید با هر دو سایت اتصالی مولکول MHC–II اتصال عرضی (Crosslinking) برقرار کرده تا میان کنش پایداری با سلول‌های T داشته باشد. SED سایت‌های اتصالی چندگانه با مولکول MHC–II دارد. انتروتوکسین SEB و توکسین TSST-1 استافیلوکوک نیز به همان ناحیه از HLA-DR1 (نوعی از مولکول MHC–II) متصل می‌شوند؛ اما توکسین TSST-1 تنها

سم استافیلوکوکی است که زمانی که از ناحیه شیار اتصالی پپتید به مولکول MHC-II متصل می‌شود گستره اتصالی خود را افزایش می‌دهد. انتروتوکسین SEE مثل SEA که از طریق زنجیره بتا متصل می‌شوند، عمل می‌کند. سایت اتصالی SEH روی مولکول MHC-II با سایت اتصالی SEI و SEA هم پوشانی دارد و معمولا به زنجیره آلفای HLA-DR1 متصل می‌شود [۲۲].



شکل ۲: مدلی از میان کنش انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی با T cell Receptors (TCR) و MHC-II

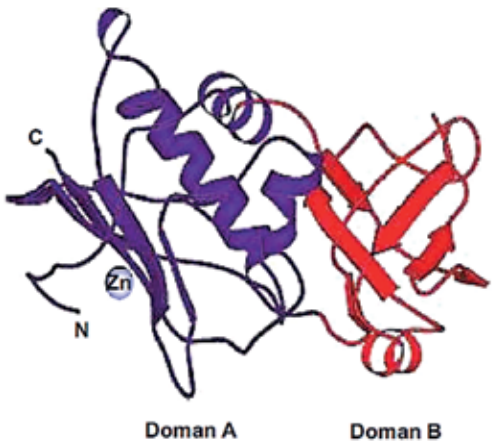
انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی زمانی که به مولکول MHC-II متصل شدند از طریق اتصال به سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن (TCR) باعث تحریک تولید T cells می‌شوند. در نهایت میان کنش سه مولکول به صورت MHC-II:SEs:TCR منجر به انتشار کنترل نشده سایتوکائین‌های پیش التهابی مختلف از جمله INF-گاما، TNF-α ، IL-1β، IL-8، IL-6 و کموکائین‌ها شده که نهایتا باعث ایجاد التهاب و شوک می‌شوند [۲۲].

ساختار انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس (SEs)

انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس به طور گسترده جزو سوپر آنتی ژن‌ها طبقه بندی می‌شوند و توانایی این را دارند که جمعیت زیادی از سلول‌های T (حدود ۳۰٪-۲۰) را تحریک و تولید سایتوکائین نمایند.

انتروتوکسین‌های SED، SEA و SEE به لحاظ توالی، ۷۰ الی ۹۰٪ با هم همولوژی دارند و فقط حدود ۴۰ الی ۶۰٪ با SEB، SEC و توکسین TSST-1 همولوژی دارند. به لحاظ توالی اسید آمینه ای، متنوع و متفاوت هستند ولی به لحاظ ساختار سه بعدی مشابه هم می‌باشند [۲۲].

ساختار سه بعدی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی به روش کریستالوگرفی مشخص می‌شود [۲۶]. این توکسین ها دو تا Domain دارند که این دومین‌ها به لحاظ اندازه نابرابر می‌باشند. در ساختار این توکسین ها دو تا زنجیره به نام‌های زنجیره β و زنجیره α وجود دارد؛ زنجیره بتا غالب بوده و زنجیره آلفا به مقدار کمتری نسبت به زنجیره بتا در ساختار SEsها وجود دارد. این دو تا Domain به وسیله یک حفره‌ای (شیار) با عمق کم از هم جدا شده اند (شکل ۳). در هر دو Domain انتهای آمینو (Amino terminal) و Carboxyl terminal وجود دارد [۲۲].



شکل ۳: ساختار سه بعدی انتروتوکسین استافیلوکی نوع A (SEA) به عنوان نمونه‌ای از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی

نتایج حاصل از بررسی ها در این حفره یا شیار موجود در ساختار انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی، نشان داده است که این حفره در اتصال توکسین به TCR(T Cell Receptors) دخیل بوده و هر گونه جهش در آن، اتصال انتروتوکسین را مختل می‌کند؛ به طوری که تجزیه و تحلیل ناشی از جهش در انتروتوکسین SEA و SEB این مهم را اثبات کرده است [۲۷, ۲۸].

ناحیه ای دیگری از SEA شناسایی شده است که به TCRهای Vβ 7 و Vβ 8.1 متصل می‌شود؛ این ناحیه Tyrosine 66 می‌باشد. این در حالی است که قسمت اتصالی SEB به مولکول MHC-II ناحیه‌ای است که از اسید آمینه‌های ٤٥ تا ٥٨ قرار گرفته است [٢٩]. تعدادی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی علاوه بر این نواحی اتصالی، دارای ناحیه اتصالی روی (Zn- binding site) هستند که در اتصال توکسین به مولکول MHC-II کمک می‌کنند [٣٠, ٣١]. مطالعات نشان داده اند که قطعه ای از توالی اسید آمینه‌ای انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی که در ناحیه (١١٨ تا ١٧٥) قرار دارند، با انتهای کربوکسیل پروتئین CD74 انسانی و موشی مشابهت دارد که در مراحل اولیه سنتز در شبکه آندوپلاسمی به مولکول MHC-II متصل می‌شود. معمول ترین و موثرترین مولکول MHC-II برای اتصال انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی که به خوبی هم مورد مطالعه قرار گرفته است، نوع HLA-DR1 (major histocompatibility complex class II, DR1) می‌باشد. HLA-DR دارای دو زنجیره α و β می‌باشد که انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی به آن‌ها متصل می‌شود (شکل ٤).

شکل ۴: ساختار سه بعدی HLA-DR به عنوان نمونه ای از ایزوفرم مولکول MHC-II

ممکن است بعضی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی به هر دو زنجیره متصل شوند مانند SED و SEA؛ در صورتی که سایر انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی به یک زنجیره متصل می‌شوند. انتروتوکسین SEA همچنین می‌تواند به سایر ایزوفرم‌های مولکول MHC-II از قبیل HLA-DP و HLA-DQ متصل شود. انتروتوکسین‌های SEB و SEC نمی‌توانند به HLA-DP متصل شوند؛ این در حالی است که در برخی از موارد با HLA-DQ واکنش می‌دهند [٣٢, ٣٣].

روش‌های تولید و خالص کردن انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آزمایشگاه

برای تخلیص و تولید انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در آزمایشگاه، معمولا از چهار روش متداول استفاده می‌کنند که به طور خلاصه و مفید، این روش ها را توضیح می‌دهیم.

۱- سلوفان (Cellophane- Over-Agar-method): این روش یکی از روش‌های متداول تولید انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی است. در این روش تکه‌های سلوفان را در اندازه‌های اینچی(٤-٣ سانتی متری) برش داده و آن‌ها را در پلیت‌های ١٠-٩ سانتی متری قرار می‌دهند. سپس چند عدد کاغذ صافی روی آن می‌گذارند. کاغذهای صافی را با آب مقطر مرطوب کرده و پلیت را در دمای ١٢١ درجه به مدت ٢٠ دقیقه اتوکلاو می‌کنند. در مرحله بعد به پلیت حاوی سلوفان، حدود ٣-٢ سی سی سوسپانسیون باکتری اضافه می‌کنند. سپس روی پلیت، محیط BHI اضافه می‌کنند تا باکتری‌های مولد توکسین رشد نمایند. پلیت را حدود ٢٤-١٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه انکوبه می‌کنند. بعد از مدت زمان انکوباسیون، حدود ٢/٥ میلی لیتر از فسفات پتاسیم (Na_2HPO_4) ٠/٠١ مولار به آن اضافه می‌کنند. بعد از حدود ٢-١ ساعت، محیط را داخل لوله آزمایش ریخته و سانتریفیوژ می‌کنند. در این حالت باکتری ها به سلوفان می‌چسبند و مایع رویی حاوی انتروتوکسین خواهد بود [٣٤, ٣٥].

۲- روش آگار نیمه جامد (Semi-solid agar method): در این روش، باکتری انتروتوکسیژنیک را در محیط BHI (BHI slant) کشت می‌دهند. سپس از کشت ٢٠-١٨ ساعته این محیط، مقداری از باکتری را برداشته و با ٤ میلی لیتر از سدیم فسفات ٠/٠٢ مولار با PH= 7.4 و NaCl 0.9% (phosphate-buffered saline) مخلوط و یک

سوسپانسیون تهیه می‌کنند. سپس این محیط را به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه انکوبه می‌کنند. در نهایت محتویات فوق را به مدت ١٠ دقیقه با دور ٣٩١٠٠ سانتریفیوژ می‌کنند. در این حالت مایع رویی حاوی انتروتوکسین خواهد بود [٣٤].

٣- روش کیسه دیالیز یا Sac culture: در این روش از کیسه‌های دیالیز 3×65 cm استفاده می‌کنند. در داخل این کیسه‌ها محیط مایع BHI می‌ریزند و باکتری را کشت می‌دهند. سپس آن را در داخل ارلن مایر U شکل حاوی آب مقطر یا بافر سالین که دارای حجم ٢٥٠ میلی لیتر است، قرار می‌دهند. سپس به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه در انکوباتور شیکر دار (200rpm) قرار می‌دهند. در این حالت، انتروتوکسین از کیسه وارد آب مقطر یا بافر سالین می‌شود. در نهایت پس از سانتریفیوژ، وجود انتروتوکسین را بررسی می‌کنند. بیشترین میزان تولید انتروتوکسین در این روش مشهود بوده و لذا پر کاربردترین و بهترین روش تخلیص انتروتوکسین محسوب می‌شود [٣٤].

٤- روش Shake- flask: در این روش ٥٠ میلی لیتر از محیط کشت را در ارلن مایر می‌ریزند و سپس ١٪ از باکتری کشت داده شده از روش سلوفان را به آن اضافه می‌کنند. سپس به مدت ٢٤-١٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه در انکوباتور شیکردار(280rpm) قرار می‌دهند؛ نهایتا سانتریفیوژ و بررسی وجود انتروتوکسین انجام می‌گیرد [٣٥, ٣٦].

روش‌های تشخیصی انتروتوکسین

روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای تشخیص انتروتوکسین‌ها وجود دارد که عبارتند از:

- **روش‌های بیولوژیک**: این روش‌ها روش‌هایی سریع، آسان و دقیق هستند ولی بر خلاف روش‌های زیستی اطلاعاتی راجع به فعالیت زیستی توکسین‌ها فراهم نمی‌آورند، از این رو روش های بیولوژیک هنوز هم به عنوان استاندارد طلایی مد نظر است. این روش بر پایه تزریق توکسین به حیوانات مختلف آزمایشگاهی از جمله موش، میمون، خرگوش و یا خوکچه هندی است [٣٧].
- **روش‌های ایمونولوژی**: این روش‌ها ارزانتر و ساده تر از روش‌های بیولوژیکی می‌باشد و شامل: روش‌های انتشار در ژل، سنجش به روش هماگلوتیناسیون، کواگلوتیناسیون، ایمونوالکتروفورز، ELISA و ELIFA می‌باشد [٣٧].
- **روش‌های مبتنی برکروماتوگرافی**: این روش‌ها نیز شامل کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی گاز مایع (GLC) و یا کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) می‌باشد که علاوه بر شناسایی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس جهت تشخیص توکسین بوتولینوم نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند [٣٧].
- **روش فلوسیتومتری**: این روش بر اساس اصول پراکندگی و انتشار نور استوار بوده و در تشخیص SEB دقت و حساسیت بالاتری داشته به طوری که در حدود یک پیکوگرم در میلی لیتر را تشخیص می‌دهد [٣٧].
- **روش Radio Immuno Assay (RIA)**: یکی دیگر از روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی انتروتوکسین، روش RIA می‌باشد که در این روش از یک ماده رادیو اکتیو به منظور نشان دار کردن آنتی ژن استفاده می‌کنند. از این روش به دلیل خطر کار با مواد رادیواکتیو، استفاده کمتری می‌شود [٣٧].
- **روش پروب‌های اسید نوکلئیک و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)**: این روش ها بسیار حساس و اختصاصی جهت سنجش و نیز تکثیر ژن‌های کد کننده انتروتوکسین می‌باشند. از این روش‌ها در سطح گسترده‌ای برای ردیابی ژن‌های مسئول در تولید توکسین‌های زیستی بهره می‌گیرند [٣٧].
- **استفاده از کیت**: امروزه برای تشخیص سریع انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس و تعیین تیپ‌های انتروتوکسین از کیت‌های تجاری استفاده می‌کنند که دقت بالاتری دارند. از جمله این کیت‌ها می‌توان به کیت‌های TECRA VIASET، RIDASCREEN SET و SET-RPLA اشاره کرد [٣٨].

روش بررسی

این مطالعه از نوع Systematic Review بوده که به جمع آوری اطلاعات از انواع مطالعات منتشر شده و با استفاده از پایگاه‌های اطلاعات متعدد مانند PubMed، Scopus، Science Direct، پایگاه اطلاعات علمی SID و IRAN MEDEX پرداخته است. بدین منظور کلید واژه‌هایی که برای جمع آوری اطلاعات از پایگاه‌های

مذکور استفاده شدند عبارت است از:

- Staphylococcal Enterotoxins
- Staphylococcal food poisoning (SFP)
- Food borne diseases
- structure of Staphylococcal Enterotoxins
- Detection of Staphylococcal Enterotoxins

بازه زمانی برای مطالعه، بین سال‌های ۱۹٦۷ تا ۲۰۱٤ در پایگاه داده‌ها انجام شد. کلیه مقالات انگلیسی و فارسی که به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس، پاتوژنز انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس، مسمومیت غذایی استافیلوکوکی ناشی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس، نقش انتروتوکسن‌های استافیلوکوکوس اورئوس در سلامت و بهداشت عمومی و روش‌های تخلیص و شناسایی انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس اشاره داشتند، انتخاب شدند. در نهایت تعداد ٤۰ مقاله برای استخراج داده‌ها و جمع آوری اطلاعات از پایگاه‌های علمی مورد بررسی قرار گرفتند.

بحث

بر اساس آمار مرکز کنترل بیماری‌های آمریکا (CDC)، بیماری‌های منتقله از مواد غذایی که به وسیله انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی ایجاد می‌شوند سالانه حدود ۸۰ میلیون نفر در این کشور را درگیر خود می‌کند که از این بین ۳۲۵۰۰۰ نفر بستری و ۵۰۰۰ نفر نیز جان خود را از دست می‌دهند [۳۹]. بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO) سالانه حدود ۲ میلیون نفر در اثر بیماری‌های اسهالی منتقله از غذا جان خود را از دست می‌دهند. اثرات اقتصادی بیماری‌های منتقله از غذا قابل توجه بوده به طوری که هزینه‌های ناشی از این بیماری ها در ایالت متحده آمریکا حتی به میزان ۳۵ بیلیون دلار نیز رسیده است [٤۰]. بیماری ایجاد شده توسط انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی معمولا دوره کمون کوتاه دارد و پس از خوردن توکسین علائمی مانند تهوع، استفراغ، دردهای عضلانی و شکمی و اسهال ظاهر می‌شود [۲۲] . مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی که از خوردن مواد غذایی آلوده به انتروتوکسین ها ایجاد می‌شوند، به علت پاستوریزاسیون ناکافی، آلودگی زدایی ناقص منبع محصول، آلودگی محصول در روند آماده سازی و حمل و نقل توسط افرادی که حامل باکتری هستند شیوع بالاتری دارد [٤۱]. از آنجا که استافیلوکوکوس اورئوس در طیف وسیعی از درجه حرارت و pH رشد می‌کند لذا ممکن است در طیف گسترده‌ای از مواد غذایی حضور داشته و رشد نماید. همچنین مواد غذایی که با سویه‌های تولید کننده انتروتوکسین آلوده شده باشند، اگر در شرایط نامناسب سردخانه‌گذاری شوند، می‌تواند منبع شیوع بیماری‌های ناشی از انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی واقع گردد [۲۲]. مواد غذایی مختلفی می‌توانند به انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی آلوده شوند. به طوری که مطالعه Vicosa و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در برزیل به منظور شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های شیر خام و پنیر نشان داد که از ۹۲ استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر خام و پنیر، ۹۱ ایزوله دارای حداقل یک ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی است. در حالت کلی ۹۷/۸٪ نمونه‌های ایزوله شده دارای ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی بوده‌اند. ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی که در این پژوهش به صورت غالب یافت شده بودند عبارت بودند از seg، sei، sem، sen و seu [٤۲]. در آوریل سال ۲۰۱۳، مسمومیت غذایی ناشی از خوردن بستنی در ۳۱ نفر مراجعه کننده به بیمارستان فرایبورگ آلمان گزارش شد. در این میان ۷ نفر بستری و بقیه سرپایی درمان شده بودند. Fetsch و همکارانش به منظور بررسی این رخداد، نمونه‌های بستنی و نمونه‌های مدفوع را مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که نمونه‌های انسانی دارای ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی sea، seb، seh، sek و seq است. نمونه‌های بستنی مورد مطالعه آن‌ها نیز که اکثریت دارای ژن‌های sea، seh، sek و seq بودند، شامل بستنی‌های وانیلی، توت فرنگی، شکلاتی، پسته‌ای و لیمویی بود [۱۷]. مطالعه Morandi و همکارانش در سال ۲۰۰٦ به منظور تشخیص انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی کلاسیک (SEA-SEE) و حضور ژن‌های آن در شیر و محصولات لبنی انجام شد. آن‌ها در این مطالعه شیرهای گاو، گوسفند، بز، بوفالو و محصولات لبنی را مورد آزمایش قرار دادند. در مجموع ۱۱۲ استافیلوکوکوس اورئوس جدا کردند که به منظور ردیابی حضور ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی (sea، sec، seg، seh، sei و sel) از

روش Multiplex-PCR و برای شناسایی انتروتوکسین (SEA-SEE) از روش پاسیو لاتکس آگلوتیناسیون بهره گرفتند. آن‌ها گزارش کردند که ۶۷٪ از سویه‌های جداسازی شده دارای ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی است. همچنین گزارش کردند که سویه‌های جداسازی شده از شیر گاو دارای انتروتوکسین‌های SEA، SED و ژن sej را دارا بوده و سویه‌های جداسازی شده از شیرهای گوسفند و بز نیز دارای انتروتوکسین SEC و ژن sel می‌باشد [۴۳]. Chiang و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مطالعه‌ای را برروی سویه‌های استافیلوکوک جداسازی شده از همه گیری‌های ناشی از مسمومیت مواد غذایی که در طی سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۱ در کشور تایوان اتفاق افتاده بود انجام دادند. آن‌ها در این مطالعه حضور انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی را در ۱۴۷سویه استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده توسط مرکز ملی کنترل بیماری‌های (NCDC) تایوان که طی این همه گیری از مواد غذایی جداسازی شده بودند را مورد بررسی قرار دادند. سویه‌های جداسازی شده را مورد آزمون کشت، میکروسکوپی و بیوشیمیایی قرار دادند و به منظور تشخیص انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی (SEA، SED، SEC، SEB و SEE) و سایر انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی از پرایمرهای اختصاصی در واکنش PCR بهره گرفتند. آن‌ها از مجموع ۱۴۷ سویه بررسی شده، تعداد ۱۳۵سویه (۹۱/۸ ٪) را به لحاظ وجود حداقل یک یا چند ژن انتروتوکسین استافیلوکوکی مثبت گزارش کردند [۴۴].

و سرانجام Rosec و همکارش Gigaud در سال ۲۰۰۱ در فرانسه، مطالعه ای را با هدف شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی (sea، seb، sec، sed و see) و انتروتوکسین‌های SEH، SEG، SEI و SEJ روی ۱۵۹ نمونه مواد غذایی مختلف از جمله پنیر، شیر، گوشت خام و پخته شده خوک، شیرینی، گوشت چرخ کرده، بستنی و سمولینای ذرت انجام دادند. از کل نمونه‌های بررسی شده، ۳۳۲ سویه استافیلوکوکی جداسازی و به لحاظ وجود ژن‌های کد کننده انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی مورد آزمایش قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که ۵۷ ٪ از سویه‌ها دارای ژن‌های انتروتوکسین استافیلوکوکی می‌باشند که غالبا از نوع انتروتوکسین‌های کلاسیک استافیلوکوکی بوده است [۴۵]. این‌ها از جمله پژوهش‌هایی است که به اهمیت و نقش انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در سلامت و بهداشت عمومی اشاره دارد.

نتیجه گیری

در این مطالعه، مروری بر شناخت انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اهمیت و پاتوژنز آن‌ها در مسمومیت غذایی استافیلوکوکی، ساختار این توکسین ها، روش‌های تشخیص و تخلیص صورت گرفت. یافته ها حاکی از آن است که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس انتروتوکسیژنیک نقش بسیار مهمی را در ایجاد مسمومیت غذایی دارد. لذا وجود انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس در ماده غذایی به عنوان یک عامل خطر برای سلامت عمومی محسوب می‌شود. اگر چه در کشور ایران نیز مطالعاتی در خصوص شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس‌های انتروتوکسیژنیک و همچنین ردیابی ژن‌های انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های مختلف مواد غذایی صورت گرفته است ولی با این وجود استاندارد و راه کار مناسبی برای جلوگیری از آلودگی مواد غذایی و بروز مسمومیت‌های ناشی از خوردن انتروتوکسین ارائه نشده است. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که رعایت بهداشت فردی در هنگام آماده سازی غذا در تمام مراحل، کاهش احتمالی خطر را در زنجیره غذایی به دنبال خواهد داشت. همچنین لزوم همکاری اپیدمیولوژیست‌ها، میکروبیولوژیست ها، کارشناسان دامپزشکی و بهداشت مواد غذایی با همدیگر به منظور کاهش مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی که ناشی از خوردن انتروتوکسین این باکتری ایجاد می‌گردد، یک پیش نیاز برای تحقق سلامت عمومی است.

References

1- Adwan GM, Abu-Shanab B, Adwan K. Enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw milk in the North of Palestine. Turkish Journal of Biology. 2006;29:229-32.

2- Akineden Ö, Hassan AA, Schneider E, Usleber E. Enterotoxigenic properties of Staphylococcus aureus isolated from goats' milk cheese. International journal of food microbiology. 2008;124:211-6.

3- Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of Staphylococcus aureus enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. International journal of food microbiology. 2010;142:74-7.

4- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. 7 ed: Springer Science & Business Media; 2007.

5- Imani-Fooladi A, Riazipour M, Sattari M. Molecular and serological detection of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus from traditionally dairy products. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2010;11:19-26.

6- Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. International Journal of Food Microbiology. 2001;68:105-13.

7- Sattari M, Mohammad Hassan Z, Azizi T, Mahdavi M, Khoramabadi N, Sadrai S, et al. Mitogenic Stimulation of Murine Lymphocyte Cells by Exposure to Staphylococcal aureus Enterotoxin B. Military Medicine Journal. 2007;9:23-9.

8- Salari Sharif A, Sattari M, Moradi M, Shahrokhabad R. Detection of Staphylococcus aureus Entrotoxin Genes A & B in Clinical Samples of the Patients Referring to the Medical Centers of Kerman and Rafsanjan Cities by PCR Technique. Journal of Rafsenjan University of Medical Sciences. 2012;11:128-36.

9- Lues J, Van Tonder I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. Food Control. 2007;18:326-32.

10- Kluytmans J, Wertheim H. Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections. Infection. 2005;33:3-8.

11- Best N, Fraser JD, Rainey PB, Roberts SA, Thomas MG, Ritchie SR. Nasal carriage of Staphylococcus aureus in healthy Aucklanders. New Zealand Medical Journal. 2011;124:31-9.

12- Eshraghi S, Salehipour Z, Pourmand M, Bakhtyari R, Mardani N, Amiri S, et al. Prevalence of tst, entC, entA and entA/C genes in staphylococcus aureus strains isolated from different foods. Tehran University of Medical journal. 2009;67:470-6.

13- Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I fromStaphylococcus aureus. Infection and immunity. 1998;66:3337-48.

14- Podkowik M, Park J, Seo K, Bystroń J, Bania J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. International journal of food microbiology. 2013;163:34-40.

15- Hu D-L, Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. European journal of pharmacology. 2014;722:95-107.

16- Detrick F, Frederick M. USAMRIID's MEDICAL MANAGEMENT OF BIOLOGICAL CASUALTIES HANDBOOK. US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, fourth ed. 2001:80-3.

17- Fetsch A, Contzen M, Hartelt K, Kleiser A, Maassen S, Rau J, et al. Staphylococcus aureus food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. International journal of food microbiology. 2014;187:1-6.

18- Banwell J, Sherr H. Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. Gastroenterology. 1973;65:467-97.

19- Hemano I, Hitchens J, Beiler J. Paradoxical intestinal inhibitory effects of staphylococcal enterotoxin. Gastroenterology. 1967;53:71-7.

20- Taylor S, Schlunz L, Beery J, Cliver D, Bergdoll M. Emetic action of staphylococcal enterotoxin A on weanling pigs. Infection and immunity. 1982;36:1263-6.

21- Merrill T, Sprinz H. The effect of staphylococcal enterotoxin on the fine structure of the monkey jejunum. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1968;18:114-23.

22- Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010;2:2177-97.

23- Hu D-L, Omoe K, Shimoda Y, Nakane A, Shinagawa K. Induction of emetic response to staphylococcal enterotoxins in the house

musk shrew (Suncus murinus). Infection and immunity. 2003;71:567-70.

24- Hu DL, Zhu G, Mori F, Omoe K, Okada M, Wakabayashi K, et al. Staphylococcal enterotoxin induces emesis through increasing serotonin release in intestine and it is downregulated by cannabinoid receptor 1. Cellular microbiology. 2007;9:2267-77.

25- Hu D-L, Omoe K, Sashinami H, Shinagawa K, Nakane A. Immunization with a nontoxic mutant of staphylococcal enterotoxin A, SEAD227A, protects against enterotoxin-induced emesis in house musk shrews. Journal of Infectious Diseases. 2009;199:302-10.

26- Singh BR, Fu F-N, Ledoux DN. Crystal and solution structures of superantigenic staphylococcal enterotoxins compared. Nature Structural & Molecular Biology. 1994;1:358-60.

27- Antonsson P, Wingren AG, Hansson J, Kalland T, Varga M, Dohlsten M. Functional characterization of the interaction between the superantigen staphylococcal enterotoxin A and the TCR. The Journal of Immunology. 1997;158:4245-51.

28- Garcia C, Briggs C, Zhang L, Guan L, Gabriel J, Rogers T. Molecular characterization of the putative T-cell receptor cavity of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. Immunology. 1998;94:160-6.

29- Kappler J, Herman A, Clements J, Marrack P. Mutations defining functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. The Journal of experimental medicine. 1992;175:387-96.

30- Sundström M, Hallén D, Svensson A, Schad E, Dohlsten M, Abrahmsén L. The Co-crystal Structure of Staphylococcal Enterotoxin Type A With Zn2+ at 2.7 Å Resolution Implications for major histocompatibility complex class II binding. Journal of Biological Chemistry. 1996;271:32212-6.

31- Sundström M, Abrahmsen L, Antonsson P, Mehindate K, Mourad W, Dohlsten M. The crystal structure of staphylococcal enterotoxin type D reveals Zn2+-mediated homodimerization. The EMBO journal. 1996;15:6832-40.

32- Bohach GA. Staphylococcal enterotoxins B and C: structural requirements for superantigenic and entertoxigenic activities. Preparative biochemistry & biotechnology. 1997;27:79-110.

33- Rich RR, Mollick JA, Cook RG. Superantigens: interaction of staphylococcal enterotoxins with MHC class II molecules. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 1990;101:195-204.

34- Robbins R, Gould S, Bergdoll M. Detecting the enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains. Applied microbiology. 1974;28:946-50.

35- Minor T, Marth E. Production of staphylococcal enterotoxin A on cellophane-over-agar. Applied microbiology. 1972;23:833-4.

36- Jarvis AW, Lawrence RC. Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. Applied Microbiology. 1970;19:698-9.

37- Ranjbar R. A review of different methods used for detection of toxins. Military Medecine Journal. 2008;10:1-10.

38- Sospedra I, Soriano JM, Mañes J. Enterotoxinomics: The omic sciences in the study of staphylococcal toxins analyzed in food matrices. Food Research International. 2013;54:1052-60.

39- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. Emerging infectious diseases. 1999;5:607-25.

40- Buzby JC, Roberts T. Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales. 1996;50:57-66.

41- Scherrer D, Corti S, Muehlherr J, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of Staphylococcus aureus isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. Veterinary Microbiology. 2004;101:101-7.

42- Vicosa GN, Le Loir A, Le Loir Y, de Carvalho AF, Nero LA. egc characterization of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolates obtained from raw milk and cheese. International Journal of Food Microbiology. 2013;165:227-30.

43- Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in Staphylococcus aureus from milk and dairy products. Veterinary microbiology. 2007;124:66-72.

44- Chiang Y-C, Liao W-W, Fan C-M, Pai W-Y, Chiou C-S, Tsen H-Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in Staphylococcus aureus isolates from food-poisoning cases in Taiwan. International journal of food microbiology. 2008;121:66-73.

45- Rosec J, Gigaud O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. International Journal of Food Microbiology. 2002;77:61-70.