بررسی چند شکلی ژن *کواگولاز استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده از نمونه‌های غذایی و انسانی به روش RFLP

رقیه بخت آور اهری[1]، چنگیز احمدی زاده[2]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد اهر،دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی ،واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.

***نویسنده مسئول:** *dr_ahmadizadeh@yahoo.com*

تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۰۷/۱۶ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۱۰/۱۶

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت های بیمارستانی به شمار می رود. در این میان پرسنل بیمارستانی و مواد غذایی جز عوامل مهمی هستند که میکروب را به سایرین منتقل می نمایند. هدف ما از این تحقیق تعیین فراوانی چند شکلی ژن کواگولاز در *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده از نمونه های مواد غذایی و انسانی می باشد. این مطالعه مقطعی توصیفی درطول ۶ ماه اول سال ۱۳۹۵ بر روی نمونه های مواد غذایی مختلف و انسانی ارسالی مشکوک به *استافیلوکوکوس آرئوس* به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شد و پس از غنی سازی اولیه، نمونه های رشد کرده در محیط های جامد بلاد آگار و مانیتول سالت آگار کشت داده شدند. برای تائید حضور ژن *کواگولاز* از پرایمرهای Coa G2 و Coa G3 استفاده شد: ژنوتایپینگ ژن *کواگولاز* با روش RFLP انجام شد که برای این منظور محصول PCR در حضور آنزیم ALUI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. محصول PCR پس از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. از مجموع ۶۳ نمونه که شامل ۱۱ نمونه پرسنلی و۵۲ نمونه مواد غذایی ۱۰ نمونه همبرگر و۷ نمونه مرغ و ۱۱ نمونه شیر۸، نمونه پنیر و ۱۲ نمونه بستنی و ۱ نمونه ماهی و ۳ نمونه بلدرچین که مورد مطالعه قرار گرفته که از بین آن‌ها ۳۵ نمونه هیچ‌گونه ژنوتیپی مشاهده نگردید و ۲۸ نمونه ناقل *استافیلوکوکوس آرئوس* بودند .با توجه به نتایج به دست آمده هیچ گونه ارتباط معنا داری بین نوع نمونه ها و ژنوتیپ سویه های استافیلوکوکوس آرئوس جدا سازی شده مشاهده نشدکه نیازمند تحقیقات بیشتر در این مورد است.

کلید واژه ها: *استافیلوکوکوس آرئوس*، کواگولاز، چندشکلی، مواد غذایی.

مقدمه

۳۰ گونه *استافیلوکوکوس آرئوس* وجود دارد که اکثرا فلور طبیعی مخاط و پوست هستند برخی بصورت فرصت طلبانه ایجاد بیماری می کنند (Lidis et al., 2007). تولید آنزیم کوآگولاز با ایجاد بیماری ارتباط مستقیم دارد (Razavilar et al., 1999). *استافیلوکوکوس آرئوس* پاتوژن مهمی در حیوانات اهلی‌اند و طیف گسترده ای از اگزوپروتئین ها را تولید می کنند که علت اصلی بیماری ها در میزبان پستانداران است (Garcia et al., 2010). *استافیلوکوک ها* در بینی، دهان، زخم ها و جوش های چرکین صورت و گردن و لای ناخن‌ها به وفور یافت می گردند و در صورت عدم رعایت بهداشت می توانند به راحتی به مواد غذایی منتقل گردند و سپس توکسین در مواد غذایی ایجادشده که غلظتش زمانی‌که تعداد *استافیلوکوک ها* در هر گرم ماده غذایی به یک میلیون برسد، برای مصرف کننده خطرناک خواهد بود (Cibayer et al., 2011). آنتروتوکسین های مترشحه از *استافیلوکوک ها* در مقابل حرارت بسیار مقاوم می باشند، پاستوریزاسیون و حتی حرارت پخت قادر به بی اثر کردن توکسین نمی باشد. صرفاً استریلیزاسیون (یعنی حرارت های بیش از ۱۱۷+ درجه سانتی گراد) اثر توکسین ترشح شده را خنثی می نماید. مهمترین مواد غذایی حساس عبارتند از غذاهای گوشتی (به ویژه کباب کوبیده)، شیر و فرآورده‌های آن (به ویژه خامه و

بستنی)، شیرینی های تر (به خصوص نان‌های خامه ای)، تخم مرغ و فرآورده‌های حاوی تخم مرغ مثل انواع کیک‌ها. به علت مقاومت زیادی که آنتروتوکسین ها در مقابل میزان aw دارند می توانند در مواد غذایی خشک از قبیل پودر تخم مرغ و شیرخشک نیز وجود داشته و آن‌ها و سایر مواد غذایی تهیه شده از آن‌ها را آلوده سازند (Ihekoronye et al.,1985). *استافیلوکوک ها* بر اساس ظاهر کلنی‌ها الگوهای همولیز آزمایش‌های بیوشیمیایی و الگوهای تعیین حدودی ژن RNA ریبوزومی طبقه بندی می گردند. ویژگی های ساختاری مانند پلی‌ساکارید کپسولی اسیدتیکوئیک و پروتئبین A با اپسونیزاسیون و در نتیجه فاگوسیتوز تداخل دارند (Marquis., 2007). کواگولاز پروتئینی است که باعث جمع شدن *استافیلوکوکسی* می شود این عامل ممکن است به علت به تجمع درآوردن *استافیلوکوکوس* ها مانع از عمل بیگانه خواری شود همچنین این عامل مسئول واکنش کواگولازی بر روی لام است و تقریبا فقط در سویه‌هایی دیده می شود که ایجاد کواگولاز خارج سلولی یا حقیقی می‌کنند. این آنزیم مقاوم به حرارت است و فعالیت آن حتی به مدت ۳۰دقیقه در۱۰۰درجه سانتی گراد حفظ می‌شود و باعث لخته شدن فیبرینوژن تخلیص شده نمی‌گردد و نیز برای لخته کردن پلاسما نیازی به حضور کلسیم ندارد (Savas et al., 2005). مشخص شده است که برای عمل لخته شدن علاوه بر فیبیرینوژن و کواگولاز به حضور عامل واکنش پذیری کواگولاز (CRF) نیز احتیاج است این عامل تبدیل فیبرینوژن به فیبرین غیر محلول را آسان می سازد (Rayesi et al., 2014). طبقه بندی بر اساس ژن کواگولاز *استافیلوکوکوس آرئوس* روشی ساده و دقیق برای تایپ بندی مولکولی می‌باشد. به طوری که رایموند و و همکاران گزارش نموده اند که این روش می‌تواند در تحقیقات اپیدمیولوژیک *استافیلوکوکوس آرئوس*های جدا شده به دلیل تکرارپذیری بالا و قدرت تفکیک و افتراق مناسب آن، مورد استفاده قرار گیرد (Hansson et al., 2001). مهم‌ترین مساله ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس آرئوس* برای بهداشت عمومی بویژه از نظر بهداشت موادغذایی مسمومیت غذایی است بوسیله انتروتوکسین تولید شده توسط میکروارگانیسم ایجاد می‌شود (Turutoglu et al., 2007). لذا بدلیل اهمیت موضوع هدف از این مطالعه حاضر بررسی چند شکلی ژن کواگولاز در *استافیلو کوکوس آرئوس* جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی و انسانی می‌باشد.

روش کار

در این مطالعه توصیفی مقطعی، نمونه‌های جمع آوری شده شامل مواد غذایی و نمونه‌های انسانی بودند که نمونه‌های مواد غذایی از شیر و پنیر و گوشت مرغ و گوشت بلدرچین و گوشت ماهی و بستنی عرضه شده بازار تبریز و نمونه‌های انسانی نیز از پرنسل بیمارستانی بیمارستانی شهر تبریزبه طور تصادفی در سال ۱۳۹۵ که ۵۳ نمونه مربوط به مواد غذایی و ۱۱ نمونه مر بوط به پرسنل بیمارستانی می‌باشند تهیه شدند. ۱۰گرم از نمونه ها را همگن کرده با سرم فیزیولوژی مخلوط و چند دقیقه بهم زده شده سپس مقدار یک سی سی برداشته شد درمحیط کشت Cook Meat Broth (مرک،آلمان) حاوی ۷/۵ درصد نمک اضافه شد در۳۷ درجه به مدت ۲۴ساعت انکوبه وسپس بهم زده در ادامه برای شناسایی و تایید *استافیلوکوکوس آرئوس* از تست های فنوتیپی معمول استفاده گردید به این صورت که روی این پرگنه های مشکوک رنگ آمیزی گرم انجام و نمونه های با ظاهر کوکسی خوشه ای گرم مثبت را برروی محیط بلاد آگار کشت دادیم. *استافیلوکوکوس آرئوس* دارای کلنی های زرد رنگ و همولیز بتا می باشند. برای تایید نمونه های مشکوک را بر روی محیط مانیتول سالت آگار و DNAase کشت دادیم که *استافیلوکوکوس آرئوس* باعث تغییر رنگ محیط MSA به زرد و ایجاد هاله روشن اطراف کشت

هاله های نقطه ای DNAase پس از ریختن اسیدکلردیک می شود در ادامه از تست های بیو شیمیایی کواگولاز نیز بهره بردیم که *استافیلوکوکوس آرئوس* که باعث انعقاد در لوله می گردد(Lee, 2003; Schmitz et al., 1997) برای تعیین هویتمولکولی باکتری های جدا سازی شده از واکنش زنجیره ای پلی مراز استفاده شد.

استخراج DNA

جهت انجام این آزمون باکتری های جداسازی شده را در محیط لوریابرتانی براث کشت داده و سپس بر طبق دستورالعمل کیت استخراج باکتری های گرم مثبت سیناژن استخراج DNA انجام گردید (علیزاده و همکاران، ۱۳۹۴).

انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز

ابتدا پرایمرها که به صورت خشک بود حل شدند، بدین صورت که برای پرایمر فوروارد ۲۰۸مایکرولیتر و برای پرایمر ریورس ۲۰۶ میکرولیتر آب مقطر اضافه و ورتکس انجام شد. سپس ۶۴ میکروتیوپ برداشته و مطابق با نمونه‌هایمان نام‌گذاری کرده از هرکدام از مواد برداشته شد و در داخل تیوپ ریخته شد و DNA برای آخر نگه داشته شد سپس از مخلوط مورد نظر ۲۳ مایکرولیتر داخل هر میکروتیوپ نام‌گذاری شده ریخته شد بعد در هر میکروتیوپ ۲مایکرولیتر از DNA مخصوص هر نمونه ریخته شد و سپس میکروتیوپ‌ها سانتریفیوژ گردید و به داخل دستگاه PCR انتقال داده شد و طبق پروتکل و شرایط دمایی گفته شده در مقاله مطابق با مشخصات زیر دستگاه را تنظیم و برای نمونه-ها PCR انجام شد:چرخه های واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، مرحله واسرشت سازی۹۵ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۸درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد (McClure et al., 2006).

جدول ۱- پرایمرها مورد استفاده در واکنش PCR

نام ژن	توالی	منبع
COA	F; 5-ATA, GAG, ATG, CTG, GTA, CAG, C -3- R; 5- GCTTCC, GAT, TGT, TCG, ATGC-3	(Hookey *et al*., 1998)

برش آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن کواگولاز

برش آنزیمی پس از تکثیر ژن کواگولاز با پرایمرهای اختصاصی، با استفاده از آنزیم‌های برشی، اجرا شد. نوع آنزیم برشی بر اساس جایگاه برشی موجود در مقالات انتخاب شد. برای هر محصول PCR دو بار واکنش هضم به طور جداگانه با آنزیم ALU (فرمنتاز، فرانسه) به عمل آمد. واکنش‌های هضم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس گرم خانه گذاری شدند و در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از آگارز ۲درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UVمشاهده و عکس‌برداری انجام شد(Hookey et al., 1998).

روش انجام RFLP

۶۴ تیوپ مطابق با نمونه ها نام‌گذاری گردید .برای انجام این مرحله از کار مقادیر مواد برای ۷۰ نمونه در نظر گرفته شد. یک تیوپ خالی ۲ میکرولیتری برداشته شد و مطابق با جدول ۳ به اندازه ی ۱۱۹۰ مایکرولیتر آب دیونیزه و سپس بافر هضمی همراه آنزیم اضافه شد و به مدت ۳۵ ثانیه ورتکس گردید. از مخلوط آماده شده با اندازه ۲۰ مایکرولیتر در داخل هر یک از تیوپ های نمونه‌ها ریخته شده و بعد به اندازه ۱۰ مایکرولیتر از نمونه‌های PCR شده اضافه گردیده و سانتریفیوژ صورت گرفته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه قرار

داده شده و سپس در فریز قرارگرفته است تا بقیه مراحل انجام گیرد.

آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE انجام شد جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه ها برروی ژل آگارز ۱درصد انتقال داده شد و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک BIORAD مورد بررسی قرار گرفت (علیزاده و همکاران، ۱۳۹۴) که پانزده نمونه اولیه حاوی دوباندی و سه باند بودند.

روش تجزیه وتحلیل دادها

بعد از استخراج نتایج ژنتیکی ،داده ها در نرم افزار Excl نسخه ۲۰۱۷مورد ویرایش قرار گرفت و سپس در نرم افزار Pupgene S2 نسخه ۱فراوانی ژنوتیپی و آللی مورد محاسبه قرار گرفت. برای بررسی ارتباط جایگاه ژن مورد بررسی با فنوتیپ از آزمون کای مربع در سطح احتمال ۹۵درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

از مجموع ۶۳ نمونه که مورد مطالعه قرار گرفت ۳۵ نمونه هیچ گونه باندی مشاهده نگردید و ۵ نمونه ۲باندی (bp۴۱۰ -bp۳۲۰) با ژنوتیپ IX و ۸ نمونه ۲ باندی (BP۴۹۰-BP۲۴۰) با ژنوتیپ VIII و ۸ نمونه ۲باندی(bp۴۹۰-bp۴۱۰) ژنوتیپ VII و ۳ نمونه ۳باندی (bp۴۹۰-bp۲۴۰-bp۱۶۰) با ژنوتیپ IV و ۲نمونه ۳باندی (bp۴۹۰-bp۲۴۰-bp۸۰) با ژنوتیپ III و ۲نمونه ۳باندی (bp۴۱۰-bp۲۴۰-bp۱۶۰) با ژنوتپ II مشاهده گردید (جدول۳ و ۴).

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپ‌های نمونه‌های مورد بررسی

	II	III	IV	IX	VII	VIII	عدم مشاهده	کل
بلدرچین	۰	۰	۰	۰	۰		۳	۳
ماهی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱
همبرگر	۱	۰	۱	۲	۱	۳	۲	۱۰
بستنی	۰	۰	۰	۱	۴	۱	۶	۱۲
شیر	۰	۰	۰	۱	۱	۲	۷	۱۱
مرغ	۱	۱	۱	۰	۰	۲	۲	۷
پنیر	۰	۰	۱	۰	۲	۰	۵	۸
پرسنل	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۹	۱۱
کل	۲	۲	۳	۵	۸	۸	۳۵	۶۳

جدول ۴-درصدژنوتیپ‌های حاصل از برش آنزیمی

ژنوتیپ‌ها	محصول PCR	RFLP (جفت باز)	تعداد (درصد)
II	۸۱۰	۱۶۰-۲۴۰-۴۱۰	۲
III	۸۱۰	۸۰-۲۴۰-۴۹۰	۲
IV	۸۱۰	۱۶۰-۲۴۰-۴۹۰	۳

VII	۸۹۰	۴۱۰-۴۹۰	۸
VIII	۷۳۰	۲۴۰-۴۹۰	۸
IX	۷۳۰	۳۲-۴۱۰	۵
عدم مشاهده			۳۵

در نمونه‌های مورد مطالعه ۳۱ نمونه مربوط به نمونه های لبنی (شیر، پنیر، بستنی) و ۲۱ نمونه مربوط به نمونه‌های گوشتی (همبرگر، مرغ، ماهی، بلدرچین) ۱۱نمونه پرسنل بیمارستانی می باشد که فراوانی باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* مشاهده گردیده در هر کدام از نمونه‌ها مطابق جدول زیر بدست آمد است (جدول۵).

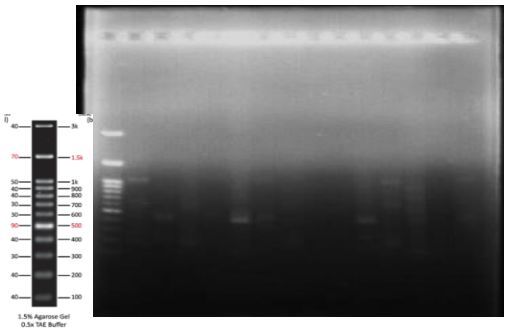
با توجه به جدول زیر که ارتباط بین نوع نمونه و ژنوتیپ مشاهده شده را نشان می دهد معلوم شد که هیچ ارتباط معنی داری بین نوع نمونه و ژنوتیپ مشاهده شده وجود ندارد ($P\leq$۰/۰۵) (جدول۶).

جدول ۵- فراوانی نمونه‌ها

	تعداد	فراوانی
بلدرچین	۳	۴/۸
ماهی	۱	۱/۶
همبرگر	۱۰	۱۵/۹
بستنی	۱۲	۱۹
شیر	۱۱	۱۷/۵
مرغ	۷	۱۱/۱
پنیر	۸	۱۲/۷
پرسنل	۱۱	۱۷/۵
کل	۶۳	۱۰۰

جدول۶- ارتباط بین نوع غذا ونوع ژنوتیپ

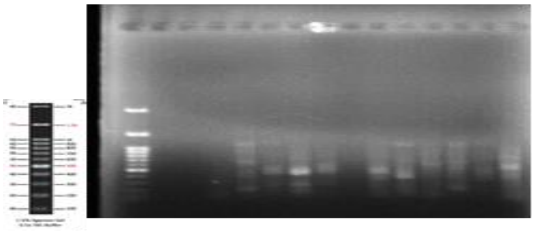
	Af	مقدار کای مربع ویرشون	ارزشP
نمونه زنوتیپ	۴۲	۴۰/۴۱۴	۰/۵۴۱



Ladde-rM14-SH59-H6-P52-SH61-B48-B64-PR15-PT1112-H43-M12-PR37-PR38

چاهک شماره یک: لدر. چاهک ۲: نمونه مربوط به مرغ و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل۸۰۰bp و ۵۹۰bp. چاهک۳: نمونه مربوط به شیرو تعداد باند مشاهده شده۲شامل ۲۴۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۴: نمونه مربوط به همبرگرو تعداد باند مشاهده شده ۲شامل ۲۴۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۵: نمونه مربوط به پنیر و تعداد باند مشاهده شده۳شامل ۱۶۰bp، ۲۴۰bp و ۴۹۰bp. چاهک ۶: نمونه مربوط به شیر و تعداد باند مشاهده شده۲شامل ۳۲۰bp و ۴۱۰bp. چاهک۷: نمونه مربوط به بستنی و تعداد باند مشاهده شده۲شامل ۴۱۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۸: نمونه پرسنلیو باندی مشاهده نشد. چاهک۹: نمونه پرسنلی باندی مشاهده نشد. چاهک۱۰: نمونه مربوط به همبرگر تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل ۲۴۰bp و bp ۴۹۰. چاهک۱۱: نمونه مربوط به مرغ و تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل۲۴۰bp، ۴۹۰bp و bp ۸۰. چاهک۱۲: نمونه پرسنلی تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل ۲۴۰bp، ۴۹۰bp و ۸۰bp. چاهک۱۳: نمونه پرسنلی باندی مشاهده نشد. چاهک۱۴: نمونه پرسنلی تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل ۴۹۰bp و bp ۷۰۰.

M8	H14	P23	B68	H50	P24	PR34	SH56	B36	SH17	PR46	B16	B59	PR48



Ladder-M13-MA9-H10-H40-B34-H4-SH37-H8-SH41

چاهک۱:لدر. چاهک۲: نمونه مربوط به مرغ و تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل ۱۶۰ bp، ۲۴۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۳: نمونه مربوط به مرغ و تعداد باند مشاهده شده۲ شامل ۲۴۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۴: نمونه مربوط به همبرگر و تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل

چاهک۵: نمونه مربوط به همبرگر و تعداد باند مشاهده شده۲ شامل ۳۲۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۶: نمونه مربوط به بستنی و تعداد باند مشاهده شده۲ شامل ۴۱۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۷: نمونه مربوط به همبرگر تعداد باند مشاهده شده۲ شامل ۴۱۰bp و ۴۹۰bp. چاهک۸: نمونه مربوط به شیر باندی مشاهده نشد. چاهک۹: نمونه مربوط به همبرگر تعداد باند مشاه.ده شده۳ شامل ۱۶۰ bp، ۲۴ bp و ۴۹۰bp. چاهک۱۰: نمونه مربوط به شیر و تعداد باند مشاهده شده۲ شامل ۲۴۰bp و ۴۹۰bp.

H56	SH19	P49	P22	B60	B4	PR62	P50	BL27	BL24	BL56	B53

بحث

تحقیقات منتشر شده حاکی از آن است که *استافیلوکوکوس آرئوس* باکتری گرم مثبتی است که طی ۱۰۰ سال گذشته دچار تغییرات ژنتیکی و در نتیجه ظهور سویه هایی با ویرولانس زیاد شده است که ضمن داشتن قدرت بیماری زایی بالا و نیز مقاومت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها در سطح جهان گسترش یافته است (Strauß et al., 2017). ین ارگانیسم دومین عامل ایجادکننده‌ی عفونت در زخم های بعد از جراحی است، انجام پژوهش‌های مختلف پیرامون این ارگانیسم ضروری به نظر می‌رسد. از مجموع ۶۳ نمونه که مورد مطالعه قرار گرفت ۳۵ نمونه هیچ گونه باندی مشاهده نگردید و ۵ نمونه ۲باندی (۴۱۰bp- ۳۲۰bp) با ژنوتیپ IX و ۸ نمونه ۲ باندی (BP۴۹۰-BP۲۴۰) با ژنوتیپ VIII و ۸ نمونه ۲باندی(۴۱۰bp-۴۹۰bp) ژنوتیپ VII و ۳ نمونه ۳باندی (۱۶۰bp-۲۴۰bp-۴۹۰bp) با ژنوتیپ IV و ۲نمونه ۳باندی(۸۰bp-۲۴۰bp-۴۹۰bp) با ژنوتیپ III و ۲نمونه ۳باندی (۱۶۰bp-۲۴۰bp-۴۱۰bp) با ژنوتپ II مشاهده گردید. نتایج مطالعه گیلی رگو یوچی و همکاران تحت عنوان میزان شیوع *استرپتوکوکوس پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در کودکان، ۱۲ ماه یا کمتر در درمانگاه مراقبت‌های اولیه در مرکز اسرائیل، نشان داد که در میان ۷۳۲ کودک مورد مطالعه ۴۲ درصد *استافیلوکوک اورئوس* جدا شد (Naimi et al., 2003).

در مطالعه کاراهان و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه مشخص شد که از مجموع ۲۰۰ سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* ۱۶۱ جدایه دارای پلی مرفیسم در ژن *COA* خود بودند. پس از هضم آنزیمی مشخص شد که ۸۳/۹ درصد از این جدایه ها تنها دارای یک باند به اندازه ۵۰۰ تا ۱۴۰۰ جفت بازی می‌باشند و ۱۶,۱درصد درای دو قطعه بودند. Coa RFLP با استفاده از آنزیم برش دهنده *AluI*، ۲۳ الگوی متفاوت در جدایه های مورد بررسی را نشان داد که ژنوتیپ XIV بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده بود (Karahan and Cetinkaya, 2007). از نظر فراوانی نوع ژنوتیپ با نتایج ما متفاوت می باشد .در مطالعه انجام شده توسط ساعی و همکاران در شهر ارومیه و تبریز روی ۵۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان ۹ ژنوتیپ متفاوت RFLP گزارش گردید (I-IX). بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ I (۳۹/۶۶ درصد) بود (Saei et al., 2009). در مطالعه little و همکاران بین سال های ۲۰۰۵-۲۰۰۴ در کشور انگلستان نتایج نشان داد که با ایجاد شرایط بهداشتی مناسب می توان از رشد باکتری جلوگیری کرد و پنیرهایی که از شیرخام به دست می آیند میزان

استافیلوکوکوس ارئوس بیشتری نسبت به پنیرهای حاصل از شیر پاستوریزه دارند (Little et al., 2008). مطالعه ای که در شهرستان مشهد بـر روی ۴۴۴ نمونـه پنیـر انجـام شـد، میـزان آلـودگی بـا اسـتافیلوکوکوس اورئـوس ۹/۴ درصد گـزارش شـد و میـزان ایـن میکروارگانیسم در پنیـر سـنتی بطـور معنـاداری بیـشتر از پنیـر هایی بود که به روش صنعتی تولید مـی شـدند، همچنـین بـین تعداد باکتری های نمونه های جمع آوری شده در فصل بهار و تابستان اختلافی مشاهده نشد (محمدی ثانی، ۱۳۸۸) مرحمتـی زاده و همکـاران ضمن بررسی آلودگی ۵۰ نمونه پنیر سنتی در شهرستان کازرون مشاهده کردند که ۲۳ تا از نمونه ها (۴۶ درصد) به *استافیلوکوکوس* آلودگی داشته و ۱۳ مورد آلوده به نوع کواگـولاز مثبـت بودنـد. (مرحمتی زاده و همکاران، ۱۳۸۶) محققـی دیگـر در یـک بررسـی مشاهده نمود که ۴۵ درصد از پنیرهای کانادایی تهیه شده از شیر خام و ۱۳ درصد از پنیرهـای تهیـه شـده از شـیر پاسـتوریزه، آلـوده بـه استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودنـد (Thatcher et al., 1956). مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی چند شکلی ژن کواگولاز *استافیلوکوکوس ارئوس* در مواد غذایی و نمونه‌های انسانی جدا شده از نمونه‌های مشکوک ارسالی به ازمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تبریز صورت گرفت. در این مطالعه از ۶۳ نمونه مورد مطالعه ۳۵ نمونه فاقد باند و ۵ نمونه با ژنوتیپ IX و ۸ نمونه با ژنوتیپ VIII و ۳ نمونه با ژنوتیپ IV و ۲ نمونه با ژنوتیپ III و۲ نمونه با ژنوتیپ II مشاهده گردید. این مطالعه با مطالعه ای که توسط سلطان دلان و همکاران انجام شد مورد مقایسه قرار گرفت که تقریبا میزان فراوانی *استافیلو کوکوس آرئوس* مشاهده شد در مواد لبنی با نتایج بدست آمده از مطالعات ما تقریبا مطابقت دارد. این مطالعه بر روی ۶۳ نمونه شامل ۱۱ نمونه پرسنلی و ۵۲ نمونه مواد غذایی (شیر، پنیر، مرغ، بلدرچین، بستنی، همبرگر) انجام گرفت که از بین آن‌ها ۳۵نمونه هیچ‌گونه ژنوتیپی مشاهده نگردید و ۲۸ نمونه ناقل *استافیلوکوکوس آرئوس* بودند. فراوانی سویه‌های VII و VIII بیشترین مقدار بود که ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ مشاهده شده و فراوانی مشاهده نگردید.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده هیچ گونه ارتباط معنا داری بین نوع نمونه ها و ژنوتیپ سویه های *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا سازی شده مشاهده نشد و فراوانی سویه‌های VII و VIII بیشترین مقدار بود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر صمیمانه سپاسگزاری می شود و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا یاری کردند تقدیر و تشکر می نمایم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد خانم رقیه بخت آور اهری با کد پایان نامه ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۴۱۰۱۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر می باشد.

منابع

۱. محمدی ثانی علی. (۱۳۸۸). بررسی پنیرهای توزیع شده به لیستریا مونوسیتوژن، *استافیلوکوکوس اورئوس* و پاتوژن های اکولی در مشهد و قوچان. دوازدهمین کنگره ملی بهداشت محیط ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۵۲۲-۵۳۳.

۲. مرحمتی زاده محمدحسین، کریم گیتی، نیک افروز ر. (۱۳۸۵). بررسی آلودگی پنیر سنتی به *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت در شهرستان کازرون، ۱۳۸۵، کنگره ملی صنایع غذایی، شماره۱۶، صفحه ۶۱.

۳. علیزاده، سجاد، امینی کیومرث، (۱۳۹۴). تعیین وجود ژن حدت پنتون والنتین لکوسیدینPVL و ژن مقاومت به متیسیلین mecA در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه های مواد غذایی به روش PCR چندگانه ای و بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی آن، سیرجان،۱۳۹۴، مجله میکروب شناسی مواد غذائی، دوره ۲، شماره۴ ، صفحات ۴۹-۵۸.

4. Aslantaş, Ö, Demir, C., TürütoğLu, H., Cantekin, Z., Ergün, Y. and Doğruer, G. 2007. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. Turk J Vet Anim Sci. 31(4): 253-257.

5. Garcia L S. *Staphylococcus*. In: Garcia L S. 2010. Clinical microbiology procedures handbook. USA .ASM Press.1450-1480.

6. Hansson, I.B. 2001. Microbiological meat quality in high-and low-capacity slaughterhouses in Sweden. J Food Prot. 64(6): 820-825.

7. Hookey, J.V., Richardson, J.F. and Cookson, B.D., 1998. Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J. Clin. Microbiol. 36(4): 1083-1089.

8. Ihekoronye, A.I. and Ngoddy, P.O., 1985. Integrated food science and technology for the tropics. Macmillan Publishers, London, 1985. ISBN 10.

9. Karahan, M. and Cetinkaya, B. 2007. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. Vet J. 174(2):428-431.

10. Lee, J. H. 2003. "Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans." Applied and Environmental Microbiology. 69(11): 6489-6494.

11. Lidis tp. 2007. Barden of methicillin-resistant *staphglococcus aureus*: facus on clinicaland economic outcomes. Pharmacotherapg. 27:1001-12.

12 .Little, C., Rhoades, J., Sagoo, S., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant K., and McLauchlin J. 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiol. 25: 304-312.

13. Liu cibayer a, cosgrove se, daum rs, fridkin sk, growtz rj. Kaplan sl, karchmeraw, Levine dp, murray be, ry bak mj,talan da, chambers hf. 2011. cinical practicegu delines by the in fections diseases society of amenca for the treat ment of methicillin-resistant *staphylo cocus aureus* infecthion in adults and children clin in fect dis. 52:1-38.

14. Marquis Q, Donnelly C, Leonard, Translator Dr. Zahraei Salehi T, Shayyeg J. 2007. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases, Tehran University Press, First Printing. 1-10.

15. McClure, J. A., Conly, J. M., Lau, V., Elsayed, S., Louie, T., Hutchins, W., and Zhang K. 2006. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Panton Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin susceptible from resistant staphylococci. J Clin Microbiol. 44: 1141-1144.

16. Naimi, T.S., LeDell, K.H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S.M., Boxrud, D.J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch, F., Fridkin, S., O'boyle, C. and Danila, R.N. 2003. Comparison of community-and health care–associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Jama. 290(22): 2976-2984.

17. Rayesi M, et al. 2014. The World of Germs, Seventh Year,Number 3 (20th Session) Fall, 0: 206-213.

18. Razavilar V. 1999. Pathogenic microbes in food and epidemiology of food poisoning. Tehran University Press.

19. Saei, H.D., Ahmadi, M., Mardani, K. and Batavani, R.A. 2009. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Vet Microbiol. 137(1-2): 202-206.

20. Schmitz, F.-J., C. Mackenzie, et al. 1997. "Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance ofstaphylococci obtained by a multiplex PCR." J. Med. Microbiol. 46(9): 773-778

21. Soni, R.N. 2009. Antimicrobial activity profiles of silver nanoparticles and their formulations.

22. Strauß L, Stegger M. 2017. Origin, evolution, and global transmission of community- acquired *Staphylococcus aureus* ST8. 114(49): 10596- 604

23. Thatcher FS, Simon W, Walter C. 1956. Extraneous Matter and Bacteria of Public Health Significance in Cheese. Canadi Pub Health. 47: 234.

Evaluation of *Staphylococcus aureus* coagulase polymorphism isolated from food and human samples

BakhtavarAhari R[1], Ahmadizadeh Ch[2*]

1. Masters Student of genetics, Faculty of Basic Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

2. Department of Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

***Corresponding author:** *ch- ahmadizadeh@iau- ahar.ac.ir*

Received: 8 October 2019 Accepted: 6 January 2020

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is one of the significant factors in the development of hospital infections. In the meantime, hospital personnel and foodstuffs are essential factors that can transfer germs to others. Our aim in this study is to determine the frequency of coagulase gene polymorphism in *S. aureus* isolated from food and human samples. This descriptive cross-sectional study was performed on suspicious samples infected to *S. aureus* in the microbiology lab of the Faculty of Veterinary Medicine in Islamic Azad University of Tabriz, during the first 6 months of the year 2016. After initial enrichment, the samples were grown in solid media Blood Agar, and Mannitol Salt agar was cultured. To confirm the presence of coagulase gene, Coa G2 and Coa G3 primers were used: Coagulase gene genotyping was performed by the RFLP method. For this purpose, the PCR product was digested in the presence of the enzyme ALUI. The PCR product was digested by agarose gel after digestion. A total of 63 samples, including 11 samples of samples and 52 food samples of 10 hamburgers and 7 samples of chicken and 11 samples of milk 8, cheese samples and 12 samples of ice cream and 1 sample of fish and 3 specimens of the quail were studied. Among them, 35 No genotypes were detected, and 28 samples of *S. aureus* were found. The results showed that no significant relation was observed between sample types and genotyping of isolated *S. aureus* strain. that needs further investigation.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, coagulase, polymorphism, foodstuffs.