

مطالعه پلی مورفیسم ژن کوآگولاز در استافیلوکوکوس آرنوس های جدا شده از شیر گاومیش

جلال شایق^{۱*}، علی رضا منادی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، استادیار گروه دامپزشکی، شبستر، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، استادیار گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: jalal_shayeghi@yahoo.co.in

(دریافت مقاله: ۹۲/۵/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۲/۹/۲۶)

چکیده

هدف از این مطالعه آنالیز ژن کوآگولاز در استافیلوکوکوس آرنوس های جدا شده از شیر گاومیش های بومی در شمال غربی ایران بود. برای این منظور تعداد ۷۵ جدایه استافیلوکوکوس آرنوس به روش PCR-RFLP مورد آزمایش قرار گرفتند. نتیجه تکثیر شده برای ژن کوآگولاز تولید باندهای با اندازه های ۶۰۰، ۷۰۰، ۷۶۰ و ۸۵۰ جفت باز بود که به ترتیب ۱۲، ۲۵، ۲۹ و ۹ مورد از جدایه های مورد آزمایش را شامل می شد. از هضم باندهای مذکور با آنزیم *AhaI* الگوهای متفاوتی از هر اندازه بدست آمد. اما الگوهای متعلق به یک اندازه، مشابه هم بودند. نتایج آنالیز ژن کوآگولاز در این مطالعه مشابه نتایج حاصل از جدایه های گاوی بودند.

واژه های کلیدی: استافیلوکوکوس آرنوس، ژن کوآگولاز، پلی مورفیسم، شیر گاومیش، PCR-RFLP

مقدمه

در دام مورد توجه قرار گیرد. همچنین از جمله بیماری های مهم که توسط این باکتری ایجاد می شود مسمومیت غذایی است که از بسیاری کشورهای جهان گزارش شده است (Razavilar, 1999). گاومیش ها حدوداً تولید ۵ در صد شیر در جهان را در اختیار داشته و در کشور ما نیز از منابع مهم تأمین شیر محسوب می شوند (Bromandi Jazi, 2006). اگر چه جداسازی و شناسایی آزمایشگاهی این باکتری کار چندان دشواری

حداقل ۳۰ گونه استافیلوکوکوس وجود دارد که اکثراً فلور طبیعی مخاط و پوست محسوب می شوند، برخی از آنان قادرند به صورت فرصت طلب ایجاد بیماری های مهمی را بنمایند، تولید آنزیم کوآگولاز با قدرت بیماری زایی آنان ارتباط مستقیم دارد. در این میان استافیلوکوکوس آرنوس اهمیت ویژه ای را داراست، چرا که می تواند به عنوان عامل بسیار مهم در ایجاد بیماری

مواد و روش ها

نمونه ها

تعداد ۷۵ جدایه از استافیلوکوکوس آرتوس های جدا شده از شیر گاومیش که قبلاً از سطح دامداری های سنتی شهرستان تبریز جمع آوری شده بود تهیه و به عنوان نمونه های مورد مطالعه استفاده شد. بر روی کلیه نمونه ها آزمایش های کامل بیوشیمیایی انجام شده و جهت حصول اطمینان بیشتر با استفاده از روش واکنش PCR بر پایه ژن نوکلئاز (nuc) نیز تعلق آنها به گونه استافیلوکوکوس آرتوس اثبات شده بود (Shayegh et al., 2013).

استخراج DNA

استخراج DNA از ۷۵ نمونه کشت داده شده در محیط آبگوشت قلب - مغز انجام شد. یک میلی لیتر از کشت های باکتریایی در شتاب $10000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از ریختن بافر لیزکننده شامل تریس ۱ مولار (pH=۷/۵)، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، C-TAB ۲ درصد بر روی رسوب مخلوط در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت در بن ماری قرار داده شده و سپس ویال های حاوی سلول های لیز شده به مدت ۵ دقیقه در شتاب $12000 \times g$ سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال های دیگر منتقل و هم حجم آن کلروفرم - ایزوآمیل الکل با نسبت های ۱:۲:۴ به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در ویال برداشتن لایه رویی و انتقال به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری دیگر، ۰/۵ میکرولیتر RNAase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در بن ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال ها را برداشته و

نمی باشد، اما هنوز اپیدمیولوژی مولکولی بیماری نیاز به تجزیه و تحلیل بیشتری دارد (Dastmalchi Saei and Ahmadi, 2010). تاکنون روش های متعددی برای مطالعه مولکولی باکتری استافیلوکوکوس آرتوس پیشنهاد شده است که از آن جمله می توان به هضم کوروموزمی DNA (Busch and Weller, 2000) multilocus sequence typing (Nitschko, 1999; Enright et al., 2000)، pulsed-field gelelectrophoresis (Melles et al., 2007) و تعیین تیپ بر اساس آنالیز ژن های Spa (Strommenger et al., 2008)، کوآگولاز (Ishino et al., 2007) و *aroA* (Marcos et al., 1999) اشاره نمود. استفاده از این تعداد روش متعدد بر این فرض استوار است که سویه های محدودی از استافیلوکوکوس آرتوس در ایجاد مسمومیت های غذایی یا بیماری خاص دخالت دارند (Fitzgerald et al., 1997). از آنجایی که عمده این مطالعات بر روی نمونه های گاوی، انسانی و حتی گوسفندی تمرکز داشته اند، مطالعه بر روی سویه های گاومیشی که جزو احشام مهم تولیدی منطقه می باشد می تواند به عنوان مطالعه ای رهگشا در این زمینه باشد. اگرچه مطالعاتی در خصوص بررسی پلی مورفیسم ژن کوآگولاز در مورد جدایه های استافیلوکوکوس آرتوس گاو از جمله در ایران انجام پذیرفته (Dastmalchi Saei et al., 2009)، اما تاکنون مطالعه ای در خصوص جدایه های استافیلوکوکوس گاومیشی انجام پذیرفته است. هدف از این مطالعه تعیین پلی مورفیسم ژن کوآگولاز استافیلوکوکوس آرتوس های جدا شده از شیر گاومیش در شهرستان تبریز بر اساس روش PCR-RFLP می باشد.

دستگاه ترموسایکلر (Techne) با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Hookey et al., 1998). از محصولات حاصله در آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز و با استفاده از ژل داکيومنت (Uvitech) عکسبرداری انجام گرفت.

هم حجم آنها ایزوپروپانول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده شد. با سانتریفیوژ در شتاب $12000 \times g$ ، DNA ترسیب و با قرار دادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک گردید. در پایان، DNA خشک شده در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل گردید (Shayegh et al., 2013).

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مرز برای ژن کواگولاز

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل کیت مستر PCR ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای اختصاصی (MWG, Germany) ۰/۴ میکرومولار (جدول ۱) و DNA استخراج شده شامل ۱ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) انجام گرفت. واکنش زنجیره پلیمرازی در

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

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

نور UV مشاهده و عکس برداری انجام شد (Hookey et al., 1998).

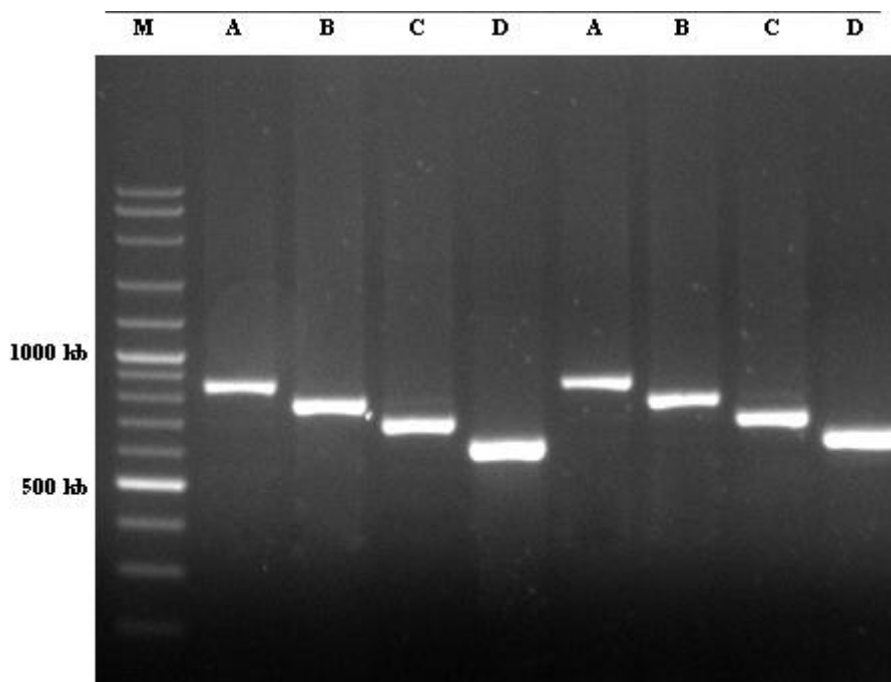
یافته‌ها

نتایج انجام واکنش PCR و برش آنزیمی برای ژن کواگولاز

ژن کواگولاز با استفاده از جفت آغازگرهای طراحی شده توسط Hookey و همکاران طی واکنش زنجیره‌ای پلی مرز تکثیر داده شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود محصولات تکثیری با اندازه‌های تقریبی ۶۰۰، ۷۶۰، ۷۰۰ و ۸۵۰ جفت نوکلئوتید حاصل شدند.

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 AluI (Fermentas) به عمل آمد. واکنش‌های هضم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند و در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از آگارز ۲ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر

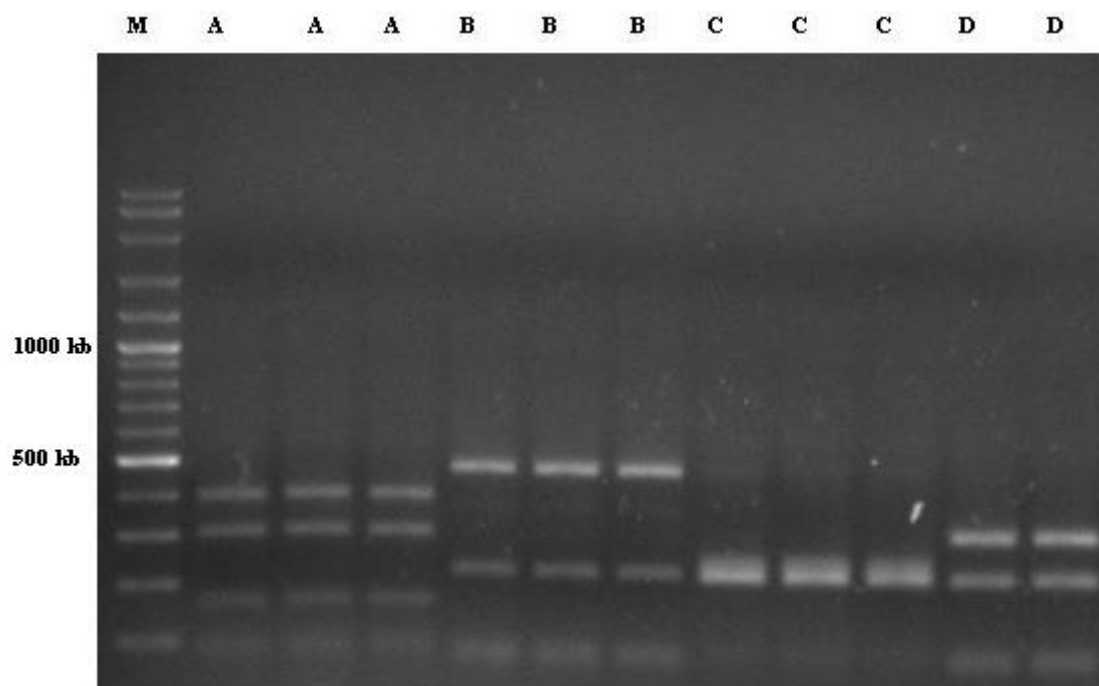


شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR نمونه های ژن کوآگولاز جداسازی شده از شیر گاومیش:
M: مارکر، A: باند ۸۵۰، B: ۷۶۰، C: ۷۰۰، D: ۶۰۰ جفت باز

محصول PCR، دو واکنش هضم به طور جداگانه با آنزیم AluI به عمل آمد. نتایج حاصل ۴ الگوی مختلف برش از ژن مورد نظر را نمایش می دهد. اما هر کدام از این الگوها مربوط به یک اندازه از محصولات تکثیری بوده و تنوع خاصی در داخل یک محصول تکثیری مشاهده نشد.

از ۷۵ نمونه استافیلوکوکوس آرتوس مورد مطالعه در این پژوهش تعداد ۱۲ نمونه حاوی ژن کوآگولاز دارای قطعه تکثیر ۶۰۰ bp جفت، ۲۵ نمونه قطعه تکثیر ۷۰۰، ۲۹، ۷۰۰، ۷۵۰ و ۹ نمونه دارای قطعه تکثیر ۸۵۰ bp بودند

نتایج حاصل از برش ژن کوآگولاز با استفاده از آنزیم برشی AluI، در شکل ۲ نشان داده شده است. برای هر



شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از برش ژن کوآگولاز با استفاده از آنزیم برشی AluI
M: مارکر. A: برش باند ۸۵۰. B: برش باند ۷۶۰. C: برش باند ۷۰۰ و D: برش باند ۶۰۰ جفت باز

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر ۴ محصول مختلف PCR متعلق به تکثیر انتهای ۳ ژن *coa* بدست آمده است. مطالعه مشابه توسط محققین دیگر نیز تنوع اندازه باند متعلق به ژن *coa* را تأیید می نمایند (Dastmalchi Saei et al., 2009; Reinoso et al., 2007). دلیل مشخصی برای این تنوع معین نشده ولی احتمالاً ردیف‌های حذفی یا جایگزینی در داخل ژن کوآگولاز موجب به وجود آمدن چنین تنوعی می گردند و این امر احتمالاً می بایستی موجب تغییر خصوصیات آنتی ژنی آنزیم در انتهای ۳ ژن کوآگولاز نیز گردد (Dastmalchi Saei et al., 2009). شاید یکی از دلایل تنوع آنتی ژنی و مقاومت عفونت‌های استافیلوکوکوس آرتوس همین امر باشد. به هر حال نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که تنوع بانندی حاصل از ژن *coa* در جدایه‌های گاومیشی

این پژوهش اولین مطالعه پلی مورفیسم ژن کوآگولاز در جدایه‌های استافیلوکوکوس آرتوس از شیر گاومیش در ایران محسوب شده می شود. مطالعه چندی در خصوص پلی مورفیسم این ژن در استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از شیر گاو در داخل کشور وجود دارد (Ishino et al., 2009; Dastmalchi Saei et al., 2007; al., 2007)؛ ولی به طور کلی مطالعات اندکی در خصوص استافیلوکوکوس‌های جدا شده از شیر گاومیش در جهان انجام پذیرفته است. اخیراً مطالعه در خصوص پلی مورفیسم ژن‌های *spa* و *aroA* در کشور انجام و نتایج آن منتشر شده است (Shayegh et al., 2013).

درونی در ژن *coa* نباشد ولی تجربیات موفقی در استفاده از آنزیم Hae III توسط دیگران گزارش شده‌اند (Dastmalchi Saei et al., 2009).

عقیده بر این است که غالب بودن الگوی خاصی از ژن کوآگولاز ممکن است با مقاوم بودن سویه‌های مذکور در برابر سیستم ایمنی میزبان مرتبط باشد این امر را می‌توان به نوعی فرار از سیستم ایمنی میزبان تلقی کرد. سویه‌های با اندازه ژنی ۷۰۰ و ۷۵۰ جفت باز آلی دارای چنین غالبیتی می‌باشند (Reinoso et al., 2007). اما برای بررسی تنوع داخل ژنی می‌بایست از آنزیم‌های برشی بیشتری که بتواند چنین تنوع را در داخل هر کدام از گروه‌های ژنی نشان دهد استفاده گردد.

استافیلوکوکوس آرتوس مشابه تنوع‌های ژن مذکور در جدایه‌های گاوی آن است.

در مطالعه حاضر آنزیم Alu I بکار رفته و اگرچه الگوی مختلف برشی از ژن *coa* در جدایه‌های گاومیشی استافیلوکوکوس آرتوس را بدست داده ولی هر یک از این الگوها متعلق به یک نوع اندازه ژن *coa* بوده و این آنزیم نتوانست تفاوت و تنوع داخلی در سائز باندهای مختلف ژن *coa* را نشان دهد. در مطالعه دیگری هم، این آنزیم نتوانسته بود برش مناسب در ژن *coa* جدایه استافیلوکوکی گاوی ایجاد نماید (Stutzenberger and San Clemente, 1967)؛ بنابراین به نظر می‌رسد آنزیم مناسبی برای نشان دادن تنوع

منابع

- برومندی جزی، مسعود (۱۳۸۴). پرورش گاومیش، انتشارات موسسه آموزشی عالی عامی کاربردی، چاپ اول. صفحه ۹۴-۱۰۴.
- رضویلر، ودود (۱۳۷۸). میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و اپید میولوژی مسمومیت‌های غذایی انتشارات دانشگاه تهران صفحه ۱۳۵-۱۲۷.
- Bromandi Jazi, M. (2006). Buffaloes culture. Applied-scientific High educational institute, Tehran [In Farsi].
- Busch, U., Nitschko, H. (1999). Methods for the differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 722: 263-278.
- Dastmalchi Saei, H., Ahmadi, M., Mardani, K., 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. Veterinary Microbiology, 137: 202-206.
- Dastmalchi Saei, H. and Ahmadi, M. (2010). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on PCR-RFLP analysis of the *aroA* gene. Comparative Clinical Pathology, 19: 163-168.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J. and Spratt, B.G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 38:1008-1015.

- Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J. and Kapur, V. (1997). Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiology and Infection*, 119: 261–269.
- Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. (1998) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. *Journal of Clinical Microbiology*.36:1083–1089.
- Ishino, K., Tsuchizaki, N., Ishikawa, J. and Hotta, K. (2007). Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism typing of the coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 607–609.
- Marcos, J.Y., Soriano, A.C., Salazar, M.S., Moral, CH., Ramos, S.S., Smeltzer, M.S. and Carrasco, G.N. (1999). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 570–574.
- Melles, D.C., van Leeuwen, W.B., Snijders, S.V., Horst-Kreft, D., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A. and van Belkum, A. (2007). Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 371–375.
- Razavilar, V. (1999). Pathogenic Microorganisms in foods and Epidemiology of food borne intoxication. Tehran University Press [In Farsi].
- Reinoso, E.B., El-Sayed, A., Lammler, C., Bogni, C. and Zschock, M., (2008). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research*, 163: 314–322.
- Shayegh, J., Barzegari, A. and Mikaili, P. (2013). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from buffaloes milk. *The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*, 19 (4): 665–668.
- Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nubel, U. and Witte, W. (2008). *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 574–581.
- Stutzenberger, F.J. and San Clemente, C.L. (1967). Nephelometric assay of bovine antistaphylocoagulase serum. *Journal of Bacteriology*, 94(4): 821–825.
- Weller, T.M. (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard?. *Journal of Hospital Infection*, 44:160–172.

Polymorphism of coagulase gene in *Staphylococcus aureus* isolated from buffaloe milk

Shayegh, J.^{1*}, Monadi, A.R.²

1- Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University (IAU), Shabestar, Iran.

2- Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University (IAU), Tabriz, Iran.

*Corresponding author email: jalal_shayeghi@yahoo.co.in

(Received: 2013/8/19 Accepted: 2013/12/17)

Abstract

The aim of this study was to analyze the *coA* gene on *Staphylococcus aureus* isolates collected from milks of native buffaloes in north-west of Iran. For this purpose, seventy five *S. aureus* isolates were examined by PCR-RFLP. Amplification of *coA* gene revealed various amplicons with a sizes of approximately 600, 700, 760 and 850 bp in 12, 25, 29 and 9 of the isolates, respectively. AluI digestion of the amplicons demonstrated that the isolates had the same PCR band size in the same PCR-RFLP patterns. The result of *coA* gen analysis was similar to the isolates from cattle milk.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Buffaloe, Milk, Coagulase gen, Polymorphism