

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

رقیه بخت آوری، چنگیز احمدی زاده\*

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](mailto:dr_ahmadizadeh@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۶

### چکیده

استافیلوکوکوس/اورئوس یکی از عوامل مهم در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. در این میان پرسنل بیمارستانی و مواد غذایی جز عوامل مهمی هستند که میکروب را به سایرین منتقل می‌نمایند. هدف ما از این تحقیق تعیین فراوانی چند شکلی ژن کواگولاز در استافیلوکوکوس آرنوس جدا شده از نمونه‌های مواد غذایی و انسانی می‌باشد. این مطالعه مقطعی توصیفی در طول ۶ ماه اول سال ۱۳۹۵ بر روی نمونه‌های مواد غذایی مختلف و انسانی ارسالی مشکوک به استافیلوکوکوس آرنوس به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شد و پس از غنی‌سازی اولیه، نمونه‌های رشد کرده در محیط‌های جامد بلاگ آگار و مانیتول سالت آگار کشت داده شدند. برای تأیید 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 پرسنی و ۵۲ نمونه مواد غذایی ۱۰ نمونه همبرگر و ۷ نمونه مرغ و ۱۱ نمونه شیر، 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 آرنوس بودند. با توجه به نتایج به دست آمده هیچ‌گونه ارتباط معنا داری بین نوع نمونه‌ها و ژنوتیپ سویه‌های استافیلوکوکوس آرنوس جدا سازی شده مشاهده نشد که نیازمند تحقیقات بیشتر در این مورد است.

**کلید واژه‌ها:** استافیلوکوکوس آرنوس، کواگولاز، چندشکلی، مواد غذایی.

### مقدمه

راحتی به مواد غذایی منتقل گردند و سپس توکسین در مواد غذایی ایجاد شده که غلظتش زمانی که تعداد استافیلوکوک‌ها در هر گرم ماده غذایی به یک میلیون برسد، برای مصرف کننده خطرناک خواهد بود (Cibayer et al., 2011). آنتروتوکسین‌های مترشحه از استافیلوکوک‌ها در مقابل حرارت بسیار مقاوم می‌باشند، پاستوریزاسیون و حتی حرارت پخت قادر به بی‌اثر کردن توکسین نمی‌باشد. صرفاً استریلیزاسیون (یعنی حرارت‌های بیش از ۱۱۷+ درجه سانتی‌گراد) اثر توکسین ترشح شده را خنثی می‌نماید. مهمترین مواد غذایی حساس عبارتند از غذاهای گوشتی (به ویژه کباب کوبیده)، شیر و فرآورده‌های آن (به ویژه خامه و

۳۰ گونه استافیلوکوکوس آرنوس وجود دارد که اکثراً فلور طبیعی مخاط و پوست هستند برخی بصورت فرصت طلبانه ایجاد بیماری می‌کنند (Lidis et al., 2007). تولید آنزیم کواگولاز با ایجاد بیماری ارتباط مستقیم دارد (Razavilar et al., 1999). استافیلوکوکوس آرنوس پاتوژن مهمی در حیوانات اهلی‌اند و طیف گسترده‌ای از آگزوپروتئین‌ها را تولید می‌کنند که علت اصلی بیماری‌ها در میزبان پستانداران است (Garcia et al., 2010). استافیلوکوک‌ها در بینی، دهان، زخم‌ها و جوش‌های چرکین صورت و گردن و لای ناخن‌ها به وفور یافت می‌گردند و در صورت عدم رعایت بهداشت می‌توانند به

آن، مورد استفاده قرار گیرد (Hansson et al., 2001). مهم‌ترین مساله ایجاد شده توسط استافیلوکوکوس آرتوس برای بهداشت عمومی بویژه از نظر بهداشت مواد غذایی مسمومیت غذایی است بوسیله انتروتوکسین تولید شده توسط میکروارگانسیم ایجاد می‌شود (Turutoglu et al., 2007). لذا بدلیل اهمیت موضوع هدف از این مطالعه حاضر بررسی چند شکلی ژن کواگولاز در استافیلوکوکوس آرتوس 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 پرسنل بیمارستانی بیمارستانی شهر تبریز به طور تصادفی در سال ۱۳۹۵ که ۵۳ نمونه مربوط به مواد غذایی و ۱۱ نمونه مربوط به پرسنل بیمارستانی می‌باشند تهیه شدند. ۱۰ گرم از نمونه‌ها را همگن کرده با سرم فیزیولوژی مخلوط و چند دقیقه بهم زده شده سپس مقدار یک سی سی برداشته شد در محیط کشت Cook Meat Broth (مرک، آلمان) حاوی ۷/۵ درصد نمک اضافه شد در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه و سپس بهم زده در ادامه برای شناسایی و تایید استافیلوکوکوس آرتوس 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 بروی محیط بلاد آگار کشت دادیم. استافیلوکوکوس آرتوس 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 آرتوس باعث تغییر رنگ محیط MSA به زرد و ایجاد هاله روشن اطراف کشت

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 شیر خشک 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 پلی ساکارید کپسولی اسیدتیکوئیک و پروتئین A با اپسونیزاسیون و در نتیجه فاگوسیتوز تداخل دارند (Marquis., 2007). کواگولاز پروتئینی است که باعث جمع شدن استافیلوکوکوسی می شود این عامل ممکن است به علت به تجمع در آوردن استافیلوکوکوس ها مانع از عمل بیگانه خواری شود همچنین این عامل مسئول واکنش کواگولازی بر روی لام است و تقریباً 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 ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه 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 فیبرینوژن و کواگولاز به حضور عامل واکنش پذیری کواگولاز (CRF) نیز احتیاج است این عامل تبدیل فیبرینوژن به فیبرین غیر محلول را آسان می سازد (Raysi et al., 2014). طبقه بندی بر اساس ژن کواگولاز استافیلوکوکوس آرتوس روشی ساده و دقیق برای تایپ بندی مولکولی می‌باشد. به طوری که رایموند و همکاران گزارش نموده اند که این روش می‌تواند در تحقیقات اپیدمیولوژیک استافیلوکوکوس آرتوس‌های جدا شده به دلیل تکرارپذیری بالا و قدرت تفکیک و افتراق مناسب

ورتکس انجام شد. سپس ۶۴ میکروتیوپ برداشته و مطابق با نمونه‌هایمان نام‌گذاری کرده از هر کدام از مواد برداشته شد و در داخل تیوپ ریخته شد و DNA برای آخر نگه داشته شد سپس از مخلوط مورد نظر ۲۳ میکرولیتر داخل هر میکروتیوپ نام‌گذاری شده ریخته شد بعد در هر میکروتیوپ ۲ میکرولیتر 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 سازی ۹۵ درجه به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد (McClure et al., 2006).

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

#### استخراج DNA

جهت انجام این آزمون باکتری های جداسازی شده را در محیط لوریابرثانی برات 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 مرز

ابتدا پرایمرها که به صورت خشک بود حل شدند، بدین صورت که برای پرایمر فوروارد ۲۰۸ میکرولیتر و برای پرایمر ریورس ۲۰۶ میکرولیتر آب مقطر اضافه و

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)

#### 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 میکرولیتر آب دیونیزه و سپس بافر هضمی همراه آنزیم اضافه شد و به مدت ۳۵ ثانیه ورتکس گردید. از مخلوط آماده شده با اندازه ۲۰ میکرولیتر در داخل هر یک از تیوپ های نمونه‌ها ریخته شده و بعد به اندازه ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌های PCR شده اضافه گردیده و سانتریفیوژ صورت گرفته و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه قرار

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 ۲ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام شد (Hookey et al., 1998).

ژن مورد بررسی با فنوتیپ از آزمون کای مربع در سطح احتمال ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج

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

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

آزمون Multiplex-PCR در دستگاه TECHNE Multiplex-PCR انجام شد جهت بررسی محصول Multiplex-PCR نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد 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 و تحلیل داده‌ها

بعد از استخراج نتایج ژنتیکی، داده‌ها در نرم افزار Excl نسخه ۲۰۱۷ مورد ویرایش قرار گرفت و سپس در نرم افزار Pupgene S2 نسخه ۱ فراوانی ژنوتیپی و آلی مورد محاسبه قرار گرفت. برای بررسی ارتباط جایگاه

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپ‌های نمونه‌های مورد بررسی

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

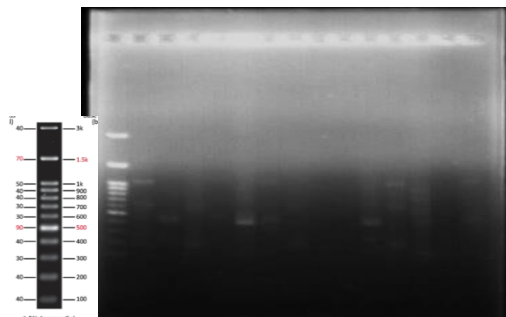
جدول ۴- درصد ژنوتیپ‌های حاصل از برش آنزیمی

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

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

جدول ۶- ارتباط بین نوع غذا و نوع ژنوتیپ

ارزش P	مقدار کای مربع ویرشون	Af	نمونه ژنوتیپ
۰/۵۴۱	۴۰/۴۱۴	۴۲	



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 شامل ۸۰۰ bp و ۵۹۰ bp. چاهک ۳: نمونه مربوط به شیرو تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل ۲۴۰ bp و ۴۹۰ bp. چاهک ۴: نمونه مربوط به همبرگر و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل ۲۴۰ bp و ۴۹۰ bp. چاهک ۵: نمونه مربوط به پنیر و تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل ۱۶۰ bp، ۲۴۰ bp و ۴۹۰ bp. چاهک ۶: نمونه مربوط به شیر و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل ۳۲۰ bp و ۴۱۰ bp. چاهک ۷: نمونه مربوط به بستنی و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل ۴۱۰ bp و ۴۹۰ bp. چاهک ۸: نمونه پرسنلی باندی مشاهده نشد. چاهک ۹: نمونه پرسنلی باندی مشاهده نشد. چاهک ۱۰: نمونه مربوط به همبرگر تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل ۲۴۰ bp و ۴۹۰ bp. چاهک ۱۱: نمونه مربوط به مرغ و تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل ۲۴۰ bp، ۴۹۰ bp و ۸۰۰ bp. چاهک ۱۲: نمونه پرسنلی باند مشاهده شده ۳ شامل ۲۴۰ bp، ۴۹۰ bp و ۸۰۰ bp. چاهک ۱۳: نمونه پرسنلی باندی مشاهده نشد. چاهک ۱۴: نمونه پرسنلی باند مشاهده شده ۲ شامل ۴۹۰ bp و ۷۰۰ bp.

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) ۱۱ نمونه پرسنل بیمارستانی می باشد که فراوانی باکتری استافیلوکوکوس آرنوس مشاهده گردیده در هر کدام از نمونه‌ها مطابق جدول زیر بدست آمد است (جدول ۵).

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 ( $P \leq 0/05$ ) (جدول ۶).

جدول ۵- فراوانی نمونه‌ها

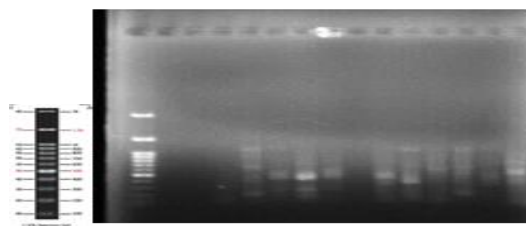
فراوانی	تعداد	
۴/۸	۳	بلدرچین
۱/۶	۱	ماهی
۱۵/۹	۱۰	همبرگر
۱۹	۱۲	بستنی
۱۷/۵	۱۱	شیر
۱۱/۱	۷	مرغ
۱۲/۷	۸	پنیر
۱۷/۵	۱۱	پرسنل
۱۰۰	۶۳	کل

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

bp490. چاهک ۴: نمونه مربوط به همبرگر و تعداد باند مشاهده

شده ۳ شامل

چاهک ۵: نمونه مربوط به همبرگر و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل bp320 و bp490. چاهک ۶: نمونه مربوط به بستنی و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل bp410 و bp490. چاهک ۷: نمونه مربوط به همبرگر تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل bp410 و bp490. چاهک ۸: نمونه مربوط به شیر بانندی مشاهده نشد. چاهک ۹: نمونه مربوط به همبرگر تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل bp160, bp240 و bp490. چاهک ۱۰: نمونه مربوط به شیر و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل bp240 و bp490.



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

چاهک ۱: لدر. چاهک ۲: نمونه مربوط به مرغ و تعداد باند مشاهده شده ۳ شامل bp160, bp240 و bp490. چاهک ۳: نمونه مربوط به مرغ و تعداد باند مشاهده شده ۲ شامل bp240 و bp490.

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

داد که در میان ۷۳۲ کودک مورد مطالعه ۴۲ درصد استافیلوکوک/اورتوس جدا شد (Naimi et al., 2003). در مطالعه کاراهان و همکاران در سال ۲۰۰۷ در ترکیه مشخص شد که از مجموع ۲۰۰ سویه استافیلوکوکوس آرتوس 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 ۱۶,۱ درصد دارای 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 (Karahana 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 اورتوس 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 ۲۰۰۴-۲۰۰۵ 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

### بحث

تحقیقات منتشر شده حاکی از آن است که استافیلوکوکوس آرتوس باکتری گرم مثبتی است که طی ۱۰۰ سال گذشته دچار تغییرات ژنتیکی و در نتیجه ظهور سویه هایی با ویروانس زیاد شده است که ضمن داشتن قدرت بیماری زا بی بالا و نیز مقاومت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکها در سطح جهان گسترش یافته است (Strauß et al., 2017). این ارگانسیم دومین عامل ایجادکننده عفونت در زخم های بعد از جراحی است، انجام پژوهش های مختلف پیرامون این ارگانسیم ضروری به نظر می‌رسد. از مجموع ۶۳ نمونه که مورد مطالعه قرار گرفت ۳۵ نمونه هیچ گونه بانندی مشاهده نگردید و ۵ نمونه ۲ بانندی (bp320 - bp410) با ژنوتیپ IX و ۸ نمونه ۲ بانندی (BP490 - BP240) با ژنوتیپ VIII و ۸ نمونه ۲ بانندی (bp490 - bp410) ژنوتیپ VII و ۳ نمونه ۳ بانندی (bp240 - bp160 - bp490) با ژنوتیپ IV و ۲ نمونه ۳ بانندی (bp490 - bp240) با ژنوتیپ III و ۲ نمونه ۳ بانندی (bp490 - bp240 - bp160) با ژنوتیپ II مشاهده گردید. نتایج مطالعه گیلی رگو یوچی و همکاران تحت عنوان میزان شیوع استریپتوکوکوس پنومونیه و استافیلوکوکوس اورتوس در کودکان، ۱۲ ماه یا کمتر در درمانگاه مراقبت های اولیه در مرکز اسرائیل، نشان

۵۲ نمونه مواد غذایی (شیر، پنیر، مرغ، بلدرچین، بستنی، همبرگر) انجام گرفت که از بین آن‌ها ۳۵ نمونه هیچ‌گونه ژنوتیپی مشاهده نگردید و ۲۸ نمونه ناقل استافیلوکوکوس آرنوس 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 معنی‌داری بین نوع نمونه‌ها و ژنوتیپ سویه‌های استافیلوکوکوس آرنوس 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 می‌شود و تمامی کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا یاری کردند تقدیر و تشکر می‌نمایم. 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 می‌باشد.

#### منابع

۱. محمدی ثانی علی. (۱۳۸۸). بررسی پنیرهای توزیع شده به لیستریا مونوسیتوزن، استافیلوکوکوس اورئوس و پاتوزن 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، شماره ۱۶، صفحه ۶۱.

استافیلوکوکوس آرنوس بیشتری نسبت به پنیرهای حاصل از شیر پاستوریزه دارند (Little et al., 2008). مطالعه ای که در شهرستان مشهد بر روی ۴۴۴ نمونه پنیر انجام شد، میزان آلودگی با استافیلوکوکوس اورئوس ۹/۴ درصد گزارش شد و میزان این میکروارگانیسم در پنیر سنتی بطور معناداری بیشتر از پنیرهایی بود که به روش صنعتی تولید می‌شدند، همچنین بین تعداد باکتری‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده در فصل بهار و تابستان اختلافی مشاهده نشد (محمدی ثانی، ۱۳۸۸). مرحمتی زاده و همکاران ضمن بررسی آلودگی ۵۰ نمونه پنیر سنتی در شهرستان کازرون مشاهده کردند که ۲۳ تا از نمونه‌ها (۴۶ درصد) به استافیلوکوکوس آلودگی داشته و ۱۳ مورد آلوده به نوع کواگولاز مثبت بودند. (مرحمتی زاده و همکاران، ۱۳۸۶) محقق دیگری در یک بررسی مشاهده نمود که ۴۵ درصد از پنیرهای کانادایی تهیه شده از شیر خام و ۱۳ درصد از پنیرهای تهیه شده از شیر پاستوریزه، آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودند (Thatcher et al., 1956). مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی چند شکلی ژن کواگولاز استافیلوکوکوس آرنوس در مواد غذایی و نمونه‌های انسانی جدا شده از نمونه‌های مشکوک ارسالی به آزمایشگاه 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 و ۲ نمونه با ژنوتیپ II مشاهده گردید. این مطالعه با مطالعه ای که توسط سلطان دلان و همکاران انجام شد مورد مقایسه قرار گرفت که تقریباً میزان فراوانی استافیلوکوکوس آرنوس مشاهده شد در مواد لبنی با نتایج بدست آمده از مطالعات ما تقریباً مطابقت دارد. این مطالعه بر روی ۶۳ نمونه شامل ۱۱ نمونه پرسنلی و

- clinical and economic outcomes. *Pharmacotherapy*. 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. clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infection in adults and children. *clin infect 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.
۳. علیزاده، سجاد، امینی کیومرث، (۱۳۹۴). تعیین وجود ژن حدت پنتون والنیتین لکوسیدین PVL و ژن مقاومت به متیسیلین *mecA* در سویه های استافیلوکوکوس آرتوس جدا شده از نمونه های مواد غذایی به روش PCR چندگانه ای و بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی آن، سیرجان، ۱۳۹۴، مجله میکروبی شناسی مواد غذایی، دوره ۲، شماره ۴، صفحات ۴۹-۵۸.
4. Aslantaş, Ö, Demir, C., TürütöğLu, 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 *staphylococcus aureus*: focus on



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 of staphylococci 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. *J. Clin. Microbiol.* 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<sup>1</sup>, Ahmadizadeh Ch<sup>2\*</sup>

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](mailto: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.