Applied Biology, Volume 11, Issue 44, 2022

Research Article

Genetic classification of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw chicken meat based on *Spa* gene[1]

Hassan Momtaz | Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran **(Corresponding author).** hamomtaz@yahoo.com
Parisa Heydari | MSc, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. pirpiranmohammad@gmail.com

Abstract

Objectives: *Staphylococcus aureus* is one of the most common causes of food poisoning in humans. Various methods including genotyping based on protein A (Spa typing) and PCR-based methods have been used for genetic classification of this bacterium. In the present study, Spa gene tracking was used for genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates.

Methods: 100 samples of raw chicken meat were collected from chicken meat supply centers in the market of Chaharmahal and Bakhtiari province. Samples were tested for *Staphylococcus aureus* bacteria by microbial culture and molecular methods and the presence of *Spa* gene in strains detected by PCR and enzymatic digestion.

Results: Out of the total of 23 isolates of *Staphylococcus aureus* studied, 6 isolates lacked the *Spa* gene. In the rest of the isolates, a fragment with a size of about 1100 to 1500 bp was detected, and based on the detected gene fragment, 17 isolates containing the *Spa* gene were divided into four genotypes I to IV; So that 9 isolates were in *SpaI* genotype, 3 isolates in *SpaII* genotype, 3 isolates in *SpaIII* genotype and 2 isolates in *SpaIV* genotype.

Conclusion: The presence of high genomic diversity in these isolates indicates cross-contamination of contamination and therefore can be prevented from the presence and growth of this bacterium in food by implementing quality control and food safety standards during the production process.

Keywords: Staphylococcus aureus, Chicken meat, Genotyping, *Spa* gene, Chaharmahal and Bakhtiari province.

1. **Received:** 2021/09/27 ; **Revision:** 2021/11/06 ; **Accepted:** 2021/12/06 ; **Published online:** 2021/12/22
© the authors http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir
Publisher: Qom Islamic Azad University

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۱، شماره ۴۴، ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گوشت مرغ بر پایه ژن *Spa*[1]

حسن ممتاز | استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران (**نویسنده مسئول**). hamomtaz@yahoo.com
پریسا حیدری | کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. pirpiranmohammad@gmail.com

چکیده

هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از شایع‌ترین عوامل مسمومیت غذایی در انسان می‌باشد. روش‌های مختلفی از جمله ژنوتایپینگ بر اساس پروتئین A (Spa typing) و روش‌های مبتنی بر PCR جهت دسته بندی ژنتیکی این باکتری به کار رفته است. در مطالعه حاضر از ردیابی ژن *Spa* جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت خام مرغ از مراکز عرضه‌کننده گوشت مرغ در سطح بازار استان چهارمحال و بختیاری، اخذ شد. نمونه‌ها جهت جستجوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کشت میکروبی و مولکولی آزمایش و حضور ژن *Spa* در ایزوله‌های جدا شده به روش PCR و هضم آنزیمی جستجو شد.

نتایج: از مجموع ۲۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه، تعداد ۶ ایزوله فاقد ژن *Spa* بودند. در بقیه ایزوله‌ها، قطعه‌ای با اندازه حدوداً ۱۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت بازی ردیابی شد که بر اساس قطعه ژنی ردیابی شده، ۱۷ ایزوله واجد ژن *Spa* در چهار ژنوتیپ I تا IV تقسیم‌بندی شدند؛ به طوری که ۹ ایزوله در ژنوتیپ *SpaI*، ۳ ایزوله در ژنوتیپ *Spa II*، ۳ ایزوله در ژنوتیپ *SpaIII* و ۲ ایزوله در ژنوتیپ *Spa IV* قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: وجود تنوع ژنومی بالا در این ایزوله‌ها نشانگر انتقال متقاطع آلودگی بوده و بنابراین، می‌توان با اجرای استانداردهای کنترل کیفیت و امنیت مواد غذایی در حین فرآیند تولید از حضور و رشد این باکتری در مواد غذایی جلوگیری کرد.

کلیدواژه‌ها: استافیلوکوکوس اورئوس، گوشت مرغ، ژنوتایپینگ، ژن *Spa*، استان چهارمحال و بختیاری.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۴۰۰/۰۷/۰۵؛ **تاریخ اصلاح:** ۱۴۰۰/۰۸/۱۵؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۹/۲۵؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۰/۱۰/۰۱
ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۱. مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های مهم منتقله از غذا است و از شایع‌ترین علل مسمومیت‌های غذایی به‌شمار می‌آید (۱). این باکتری در بسیاری از کشورها به عنوان سومین عامل بروز بیماری‌های غذایی بعد از *سالمونلا* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* شناخته شده است (۲). شیر، فرآورده‌های شیری و گوشت از جمله غذاهای مرتبط با مسمومیت استافیلوکوکوسی محسوب می‌شوند (۱). این باکتری در دمای اتاق به سرعت تکثیر یافته و انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت خود را ترشح می‌کند و مصرف غذاهای آلوده به این توکسین‌ها باعث ایجاد مسمومیت غذایی می‌شود. *استافیلوکوکوس اورئوس* همچنین عامل بیماری‌های مختلفی در انسان مثل عفونت‌های پوست و بافت نرم، باکتریمی و پنومونی بوده و به عنوان یک مشکل جدی در بیمارستان‌ها و صنعت غذایی به‌شمار می‌رود (۳). بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط ساختار باکتریایی و ترشحات خارج سلولی مثل انواع توکسین‌ها ایجاد می‌شود. در دهه‌های اخیر استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها عامل ظهور سویه‌های باکتریایی مقاوم چند دارویی شده است. *استافیلوکوکوس اورئوس* ظرفیت تطابق‌پذیری بالایی به شرایط محیطی مختلف داشته و به سرعت، به تقریباً تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شود (۴). اخیراً سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چند دارو مکرراً از همه‌گیری‌های ناشی از مسمومیت‌های غذایی، گزارش و از محصولات غذایی متعددی جداسازی شده‌اند (۳،۵،۶).

در گذشته از روش‌های فنوتیپی برای تیپ‌بندی *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده می‌شد. امروزه با گسترش روش‌های مولکولی، از روش‌های مختلف ژنوتایپینگ مولکولی نظیر روش‌های وابسته به PCR مثل ERIC-PCR، RAPD-PCR و Rep- PCR، آنالیز ژن‌های اصلی باکتری نظیر *spa*، ژن *agr* و ژن *coa* استفاده می‌شود.

در روش spa typing، ناحیهٔ x از ژن *spa* (رمزکننده پروتئین سطحی A) با PCR گسترش یافته و توالی‌یابی می‌شود. به دلیل اینکه ناحیهٔ x دارای پلی‌مورفیسم بالایی است، می‌تواند در بررسی‌های افتراقی و تیپ‌بندی استفاده شود. این روش در مقایسه با روش PFGE، قدرت تمایز کم‌تر و نسبت به روش MLST، قدرت تمایز بالاتری دارد. این روش نسبت به روش‌هایی مثل MLST که نیاز به توالی‌یابی حداقل ۷ ژن دارد و یا روش PFGE، مقرون به صرفه‌تر است (۷،۸).

با توجه به اینکه گوشت و محصولات گوشتی به عنوان مخازن مهم *استافیلوکوکوس اورئوس*

شناخته شده و در گسترش شیوع این باکتری دخیل هستند، هدف مطالعه حاضر، دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ بر پایه ردیابی ژن *spa* است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. نمونه‌گیری و جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*

تعداد ۱۰۰ نمونه گوشت مرغ در سطح استان چهارمحال و بختیاری در یک دوره زمانی ۶ ماهه از اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۸ تا مهرماه ۱۳۹۸ از مراکز عرضه گوشت خام مرغ، تهیه شد.

جهت نمونه‌برداری، ۱۰ گرم گوشت مرغ (از عضله سینه) گرفته شد و در لوله‌های استریل حاوی محیط مولر هینتون براث دارای 10% NaCl قرار گرفت. نمونه‌های گوشت مرغ بلافاصله بعد از نمونه‌گیری به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از غنی‌سازی، نمونه‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط مانیتول سالت آگار انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. کلنی‌های دارای هاله زرد بر روی محیط مانیتول سالت آگار انتخاب شده و پس از خالص‌سازی، بر روی محیط نوترینت آگار با مشاهده میکروسکوپی و روش‌های بیوشیمیایی مرسوم (تست‌های کاتالاز، کواگولاز و DNase)، کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند (۹).

۲-۲. تائید استافیلوکوکوس اورئوس

جهت تائید قطعی وجود *استافیلوکوکوس اورئوس* در پرگنه‌های انتخابی، از آزمایش PCR استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی ایزوله‌های رشد یافته در محیط TSB به روش جوشاندن (Boiling) استخراج گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط مایع TSB با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر Nuclease free به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفوژ لوله‌های مربوط در g* ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه مایع رویی رسوب به عنوان منبع DNA برداشت و در دمای ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای

F: 5'- AAAGGTCTCGGTAGTAACGGGCTA-3'

R: 5'- AAATGCTACTACTATAAGCTGCGAT-3'

(با ردیابی ژن *16srDNA*) معرفی شده توسط Kumar و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت (۱۰).

۲-۳. ردیابی ژن *Spa*

جهت دسته‌بندی ژنتیکی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ، از ژنوتایپینگ ژن *Spa* استفاده شد. در این مرحله ایزوله‌های جداشده از مرحله قبلی انتخاب و با استفاده از زوج پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن

*Spa*1: ATCTGGTGGCGTAACACCTG
*Spa*2: CGCTGCACCTAACGCTAATG

معرفی شده توسط افروغ و همکاران (۲۰۱۲) آزمایش شدند (۱۱).

برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله عبارت بود از: یک سیکل $94^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل تکراری $95^{\circ}C$، ۱ دقیقه، $55^{\circ}C$، ۱ دقیقه و $72^{\circ}C$، ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی $72^{\circ}C$ به مدت ۹۰ ثانیه.

در انجام آزمایش، از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از ژنوم استخراج شده سویه استاندارد شماره ATCC 25923 استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده بر پایه ژن *Spa* از هضم آنزیمی محصول *Spa* در حضور آنزیم اندونوکلئاز تعیین حدودی *Rsa*I (فرمنتاس لیتوانی) استفاده شد. واکنش هضمی در حجم ۲۰ میکرولیتر با اجزاء زیر تنظیم شد (۱۱):

Tango buffer 2x	۴µl
PCR Product	۱۲µl
RsaI	۱µl
D.D. water	۳µl

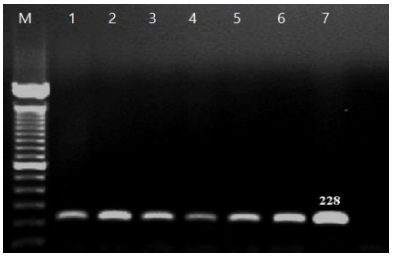
واکنش در دمای ۳۷ درجه بن ماری به مدت ۱۸ساعت انجام شد.

جهت ارزیابی محصول PCR از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد. الکتروفورز با دستگاه Labnet (فرانسه) در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً ۲ ساعت انجام گرفت. در پایان از ژل حاصل با کمک دستگاه Uvitech (انگلستان) در زیر نور UV تصویربرداری شد و نتایج ثبت گردید.

۳. یافته‌ها

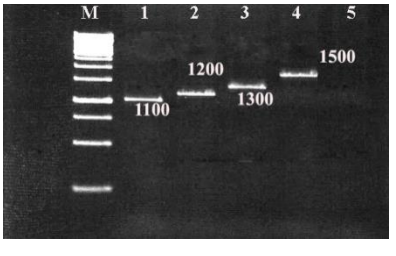
از جمع ۱۰۰ نمونه أخذ شده از گوشت مرغ در استان چهارمحال و بختیاری، تعداد ۲۳ نمونه

(۲۳درصد) آلوده به *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند که تمام ایزوله‌های فوق از نظر خصوصیات بیوشیمیایی ازجمله رنگ‌آمیزی گرم، همولیز، کاتالاز و کواگولاز، تخمیر مانیتول، دارای خصوصیات *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند؛ یعنی این ایزوله‌ها واجد پرگنه‌هایی همولیتیک دارای کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای شکل، کاتالاز مثبت، کواگولاز مثبت بوده که در محیط MSA با تخمیر قند مانیتول محیط را زرد رنگ کرده‌اند. تمام ایزوله‌های فوق در آزمایش PCR با ردیابی ژن *16srDNA* تأیید شدند که نتیجه حاصل در تصویر (۱) نشان داده شده است:



تصویر ۱- ژل حاصل از ردیابی ژن *16srDNA* در ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ در استان چهارمحال و بختیاری (ستون M = مارکر ۱۰۰جفت بازی DNA، ستون ۷ نمونه کنترل مثبت، ستون‌های ۱ تا ٦ = ایزوله‌های مورد مطالعه)

هدف اصلی مطالعه حاضر، ژنوتایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ بر پایه ژن *Spa* بود که برای این منظور حضور ژن کدکننده پروتئین A در سطح *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۲۳ ایزوله مورد مطالعه به روش PCR ارزیابی گردید که ژل حاصل از ردیابی این ژن در تصویر (۲) ارائه شده است:



تصویر ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *Spa*
(ستون M = مارکر ۱کیلو بازی DNA، ستون‌های ۵-۱ ایزوله‌های مورد مطالعه)

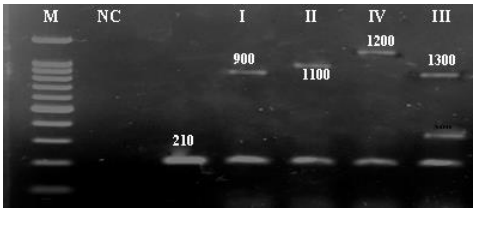
از مجموع ۲۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه، تعداد ۶ ایزوله فاقد ژن *Spa* بودند.

در بقیه ایزوله‌ها قطعه‌ای با اندازه حدوداً ۱۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت بازی ردیابی شد که بر اساس قطعه ژنی ردیابی شده، ۱۷ ایزوله واجد ژن *Spa* در چهار ژنوتیپ I تا IV تقسیم‌بندی شدند؛ به طوری که ۹ ایزوله در ژنوتیپ *SpaI* (اندازه قطعه ۱۲۰۰-۱۱۰۰ جفت باز)، ۳ ایزوله در ژنوتیپ *Spa II* (قطعه ۱۳۰۰-۱۲۰۰جفت باز)، ۳ ایزوله در ژنوتیپ *SpaIII* (قطعه ژنی ۱۴۰۰-۱۳۰۰جفت باز) و ۲ ایزوله در ژنوتیپ *Spa IV* (اندازه قطعه ۱۵۰۰-۱۴۰۰جفت باز) قرار گرفتند. ژنوتیپ *Spa* I با فراوانی ۵۲/۹۴ درصد شایع‌ترین و ژنوتیپ IV با فراوانی ۱۱/۷۶ درصد نادرترین ژنوتیپ شناخته شده ژن *Spa* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ بودند (جدول ۱). در تجزیه و تحلیل آماری نتایج فوق با مدل آماری مربع کای، اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ I با دیگر ژنوتیپ‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=۰/۰۳۹) مشاهده شد. در جدول (۱) توزیع ژنوتیپ‌های شناخته شده ژن *Spa* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ نشان داده شده است.

جدول ۱- توزیع ژنوتیپ‌های ژن *Spa* در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ در استان چهارمحال و بختیاری

تعداد ایزوله	تیپ *Spa*
۶	عدم وجود باند
۹	*I*
۳	*II*
۳	*III*
۲	*IV*

در آنالیز ایزوله‌های *Spa* مثبت با روش RFLP الگوی باندی متفاوتی در هر ژنوتیپ با برش آنزیمی توسط آنزیم *Rsa*I مشاهده شد که ژل حاصل از برش آنزیمی تعدادی از ایزوله‌ها در هر ژنوتیپ در تصویر (۳) نشان داده شده است:



تصویر ۳- ژل حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR مربوط به ژن *Spa* با آنزیم *Rsa*I در تعدادی از ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از گوشت مرغ در استان چهارمحال و بختیاری

در هضم آنزیمی محصول PCR ژن *Spa* در ایزوله‌هایی متعلق به تیپ SpaI دو قطعه ۲۱۰ و ۹۰۰ جفت بازی، در ایزوله‌های تیپ *SpaII* دو قطعه ۲۱۰ و ۱۱۰۰ جفت بازی، در ایزوله‌های واجد تیپ *SpaIII* سه باند ۹۰۰،۳۰۰،۲۱۰ جفت بازی مشاهده شد. در ایزوله‌های متعلق به تیپ *SpaIV* دو الگوی باندی متفاوت یافت شد؛ به طوری که از ۲ ایزوله متعلق به این تیپ، ۱ ایزوله دارای باندهای ۲۱۰ و۱۲۰۰ جفت بازی بودند و ۱ ایزوله قطعات ۱۲۰۰،۱۱۰۰،۳۰۰،۲۱۰ جفت بازی را در هضم آنزیمی محصول PCR نشان دادند.

٤. بحث

در مطالعه حاضر میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل ۲۳ درصد برآورد شد. میزان بالای آلودگی می‌تواند به دلایل مختلفی چون عدم رعایت بهداشت در حین فرآیند، توزیع و عرضه گوشت باشد. تفاوت در میزان شیوع گزارش‌شده در کشورهای مختلف و حتی در یک کشور ممکن است به علت فاکتورهای متنوعی چون نوع و تعداد نمونه، روش جداسازی، شرایط جغرافیایی متفاوت و شرایط بهداشتی گوناگون باشد. علاوه بر این فقدان یک روش استاندارد جداسازی بین‌المللی، امکان مقایسه بین مطالعات مختلف را مشکل می‌کند (۱۲). با این حال اکثر مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که نمونه‌های گوشت مرغ به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده می‌باشند. حضور این باکتری بر روی گوشت مرغ می‌تواند به دلیل تماس لاشه با پوست و محتویات دستگاه گوارش در حین فرآیند کشتار، آلودگی محیط و یا عدم رعایت بهداشت فردی باشد. با توجه به اینکه حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی معمولاً به دلیل آلودگی مستقیم توسط دست کارگران یا عطسه و سرفه می‌باشد، لذا، مراحل مختلف کشتار و دست‌کاری لاشه توسط افراد می‌تواند میزان شیوع را تحت تأثیر قرار دهد. به همین علت پژوهش‌های فراوانی در خصوص آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی در تمام نقاط دنیا انجام شده است که تمام این بررسی‌ها گویای آلودگی صفر تا ۱۰۰ درصدی مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس* است. در مطالعه حاضر، میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های گوشت مرغ در سطح استان چهارمحال و بختیاری، ۲۳ درصد بود که این نتایج با نتایج بسیاری از مطالعات دیگر همخوانی دارد (۱۳). در پژوهش‌های انجام شده توسط نور مانو و همکاران با استفاده از روش‌های PFLP و PCR به مدت ۳ سال (۲۰۰۵ تا ۲۰۰۳) بر روی ۱۶۳۴ نمونه گوشت و شیر تولیدی در ایتالیا، آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود ۱۲/۸ درصد گزارش شد که به‌طور خالص از

۹۹۳ نمونه گوشت در حدود ۱۰ درصد به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده بودند (۱۴). در پژوهش سوریانو و همکارانش نیز میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۳۴۲ نمونه غذای آماده مصرف، ۳/۵ و ۷/۶ درصد تعیین شد. همچنین آن‌ها در سال ۲۰۰۲ در اسپانیا با به‌کارگیری مبانی GMP و HACCP درصد آلودگی یک نوع غذای آماده به مصرف به *استافیلوکوکوس اورئوس* را به میزان ۲۱ درصد کاهش دادند (۱۵). مطالعه بوئی و همکاران (۲۰۱۰)، در ویتنام گویای آن است که درصد شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در ۲۱۲ نمونه از غذاهای آماده به مصرف ۲۲/۲ درصد است که این درصد بالای آلودگی می‌تواند به علت عدم کنترل دقیق بهداشتی در حین تولید غذا، آلودگی ثانویه در حین انتقال و نگهداری، استفاده مجدد از ظروف و تجهیزات و بسته‌بندی‌های اولیه نامناسب باشد که این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مشابه است (۱۶). در مطالعه جن سی، ۶۵/۶ درصد گوشت گوساله، ۵۵ درصد گوشت طیور، ۷۳/۹ درصد محصولات لبنی، ۷۷/۷ درصد مواد اولیه غذاها از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بودند که میزان آلودگی این پژوهش بیشتر از نتایج مطالعه حاضر بود (۱۷). تاکنون مطالعاتی در ایران به منظور بررسی آلودگی گوشت و طیور به *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام شده است (۱۸). جوادی و صفرمشائی در مطالعه‌ای بر روی گوشت طیور نشان دادند که ۶۵ درصد نمونه‌های گوشت طیور از نظر حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت بوده است (۱۹). در همین راستا، نتایج حاصل از پژوهش فیضی و همکاران آلودگی گوشت طیور را به *استافیلوکوکوس اورئوس* ۸۱/۷۵ درصد (۲۰) و اشراقی و همکاران ۳/۵ درصد گزارش کرده‌اند (۱۸). علت اصلی اختلاف در میزان شیوع باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* در مطالعات متفاوت، مربوط نوع نمونه مورد بررسی، روش نمونه‌گیری، روش انجام آزمایش، منطقه جغرافیایی، شرایط آب و هوایی و سطح رعایت بهداشت در منطقه است.

یکی از روش‌های مولکولی مورد استفاده در ژنوتایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی تنوع در ژن پلی مرفیک ناحیه X-region پروتئین A استافیلوکوکوس (*Spa*) یا *Spa* تایپینگ است. ژن *Spa*، با تنوع‌پذیری ناحیه X جهت تایپینگ ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، مورد توجه محققین می‌باشد (۲۱،۲۲).

در مطالعه حاضر ۲۳ ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* واجد ژن *Spa* چهار الگو (چهار ژنوتیپ) مختلف با اندازه باندهای ۱۲۰۰-۱۱۰۰جفت باز (تیپ I)، ۱۳۰۰-۱۲۰۰ جفت باز (تیپ II)، ۱۴۰۰-۱۳۰۰ جفت باز (تیپ IV) شناسایی شد که در آزمایشRFLP با هضم آنزیمی محصول

PCR مربوط به هر ژنوتیپ الگوی باندی متفاوتی با قطعات ۲۱۰ تا ۱۲۰۰ جفت باز، شناسایی شد.

در مطالعه حاضر ۵ سایز متفاوت ۲۱۰، ۱۱۰۰، ۱۲۰۰، ۳۰۰، ۹۰۰ جفت بازی از ژن *Spa* در ۲۳ ایزوله جدا شده از گوشت مرغ شناسایی شد.

سلاسیا[1] و همکاران (۲۰۰۴)، امپلیکون‌هایی در ۹ سایز متفاوت ۱۰۰ تا ۳۴۰ جفت بازی از ژن *Spa* را در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد اورام پستان تحت بالینی در گاو گزارش کردند (۲۳).

بیستران[2] و همکاران (۲۰۰۹)، در ایزوله‌های جدا شده از شیر فرآوری شده گاو، ۱۰ امپلیکون سایز متفاوت از ژن *Spa* را ردیابی کردند که این امپلیکون‌ها دارای ۳ تا ۱۴ تکرار بودند و بالاترین لوکوس مشاهده شده، لوکوس ۸ تا ۱۰ تکراری بودند (۲۴). در مطالعه کاراهان[3] و همکاران (۲۰۱۱)، اندازه محصول ژن *Spa* در ایزوله‌های جدا شده از موارد ورم پستان بین ۱۰۰ تا ۳۲۰ جفت باز بود و امپلیکون ۲۹۰ جفت بازی با لوکوس ۱۰ تکراری، غالب‌ترین ژنوتیپ ردیابی شده در این مطالعه بود (۲۵). در مطالعه باتی[4] و همکاران (۲۰۱۶)، ۱۷ امپلیکون از ژن *Spa* با تعداد بیش از ۷ تکرار در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی شد و سه ژنوتیپ ژن *Spa* در ایزوله‌های جدا شده از گاوهای هولشتاین و فرزی و ۹ ژنوتیپ در ایزوله‌های جدا شده از گاوهای راتی[5] یافت شد (۲۶). فرنی[6] و همکاران (۱۹۹۴)، نیز گزارش دادند که متداول‌ترین سویه‌های MRSA *استافیلوکوکوس اورئوس*، واجد بیش از ۷ تکرار لوکوس در ژن *Spa* هستند؛ در حالی‌که سویه‌های غیرشایع *استافیلوکوکوس* حاوی ۷ یا کم‌تر از ۷ تکرار لوکوس می‌باشند (۲۷). تعداد تکرارها با پتانسیل انتشار *استافیلوکوکوس اورئوس* مرتبط است. سویه‌های با بیش از ۷ تکرار در ناحیه X-region گرایش به ایجاد بیماری همه‌گیر دارند (۲۸).

1. Salasia
2. Bystran
3. Karahan
4. Bhati
5. Rathi
6. Freney

۵. نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ردیابی ژن *Spa* و محاسبه تعداد لوکوس‌های تکراری ۲۴ جفت بازی در ناحیه X-region پروتئین A *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به عنوان یک ابزار مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف این باکتری مورد استفاده قرار گیرد.

٦. تقدیر و تشکر

نویسندگان پژوهش حاضر از زحمات مدیریت محترم بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مهندس سهراب صفری تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. Kadariya J, Smith TC & Thapaliya D. Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Research International.* 2014; 827965. **DOI:** 10.1155/2014/827965
2. Wei-Wei L, Zhu J, Zhen S, Liang X, Jiang Y & Ning L. Analysis of foodborne disease outbreaks in China mainland in 2011. *Chines Journal of Food Hygiene*. 2018; 30: 283-8.
3. Jackson CR, Davis JA & Barrett JB. Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from retail meat and humans in Georgia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013; 51(4): 1199-207.
4. McCallum N, Berger-Bächi B & Senn MM. Regulation of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010; 300(2-3): 118-29.
5. Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, Boukouvala E, Zdragas A, Papa A, Hadjichristodoulou C & Sergelidis D. Prevalence of Staphylococcus aureus and of methicillin-resistant S. aureus (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiology.* 2018; 69: 43-50.
6. Wu S, Huang J, Wu Q, Zhang J, Zhang F, Yang X, Wu H, Zeng H, Chen M, Ding Y & Wang J. Staphylococcus aureus isolated from retail meat and meat products in China: incidence, antibiotic resistance and genetic diversity. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 2767.
7. Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM & Kreiswirth BN. Spa typing method for discriminating among Staphylococcus aureus isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro-and macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(2): 792-9.
8. Strommenger B, Braulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nubel U & Witte W. Spa typing of Staphylococcus aureus as a frontline tool in epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(2): 574-81.
9. Farahmand S, Haeili M, Darban-Sarokhalil D. Molecular Typing and Drug Resistance Patterns of Staphylococcus aureus Isolated from Raw Beef and Chicken Meat Samples. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2020; 14(5): 478-89.
10. Kumar R, Yadav BR & Singh RS. Genetic determinants of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Current Microbiology*. 2010; 60(5): 379-86.
11. Afrough P, Pourmand MR, Zeinalinia N, Yousefi M, Abdossamadi Z & Bagherzadeh Yazdchi S. Molecular typing of clinical and nasal carriage isolates of Staphylococcus aureus by spa gene patterns. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2012; 22(94): 28-34.
12. Börjesson S. *Antibiotic Resistance in Wastewater: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and antibiotic resistance genes*. Doctoral dissertation, Linköping University Electronic Press, 2009.

13. Momtaz H, Dehkordi FS, Rahimi E, Asgarifar A & Momeni M. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of Staphylococcus aureus isolated from chicken meat in Isfahan province, Iran. *Journal of Applied Poultry Research*. 2013; 22(4): 913-21.
14. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S & Shinagawa K. Detection of seg, seh, and sei genes in Staphylococcus aureus isolates and determination of the enterotoxin productivities of S. aureus isolates harboring seg, seh, or sei genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(3): 857-62.
15. Soriano JM, Rico H, Molto JC & Manes J. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food Control*. 2002; 13(4-5): 253-61.
16. Huong BT, Mahmud ZH, Neogi SB, Kassu A, Van Nhien N, Mohammad A, Yamato M, Ota F, Lam NT, Dao HT & Khan NC. Toxigenicity and genetic diversity of Staphylococcus aureus isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. *Food Control.* 2010; 21(2): 166-71.
17. Gencay YE, Ayaz ND & Doğru AK. Enterotoxin gene profiles of Staphylococcus aureus and other Staphylococcal isolates from various foods and food ingredients. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2010; 7(2): 75-80.
18. Eshraghi S & Salehipur Z. Detection of tst, sec, sea and sec + sea in staphylococcus aureus isolated from different food sampling. *Tehran Medical University Journal.* 2008; 67(7): 470-6.
19. Javadi A & Safarmashaei S. Microbial profile of marketed broiler meat. *Middle-East Journal of Scientific Research.* 2011; 9(5): 652-6.
20. Feizi A, Nazeri M & Pilevar A. Isolation of Staphylococcus spp. genera from broiler breeder flocks in East Azerbaijan Province of Iran: Prevalence and antimicrobial susceptibility. *African Journal of Microbiology Research*. 2012; 6(28): 5819-23.
21. Ajello L, Hay R, *Topley WW & Wilson SG. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Medical Mycology*. Arnold; 1998.
22. Songer JG & Post KW. *Veterinary microbiology-E-book: bacterial and fungal agents of animal disease*. Elsevier Health Sciences; 2004.
23. Salasia SI, Khusnan Z, Lammler C & Zschock M. Comparative studies on pheno-and genotypic properties of Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *Journal of Veterinary Science*. 2004; 5(2): 103-9.
24. Bystroń JA, Bania J, Lis EL, Molenda J & Bednarski M. Characterisation of Staphylococcus aureus strains isolated from cows' milk. *Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy*. 2009; 53(1): 59-63.
25. Karahan M, Acik MN & Cetinkaya B. Investigation of virulence genes by PCR in Stapylococcus aureus isolates originated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Pakistan Veterinary Journal*. 2011; 31(3): 249-53.
26. Bhati T, Nathawat P, Sharma SK, Yadav R, Bishnoi J & Kataria AK. Polymorphism in spa gene of Staphylococcus aureus from bovine subclinical mastitis. *Veterinary World.* 2016; 9(4): 421.

27. Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Van Leeuwen WJ & Mooi FR. Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains on the basis of protein A gene polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32(3): 846-7.
28. Kuzma K, Malinowski ED, Lassa HE & Klossowska A. Analysis of protein A gene polymorphism in Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis. *Bulletin of the Veterinary Instit27ute in Pulawy*. 2005; 49: 41-4.