Journal of Military Medicine
2019, Volume 21, Issue 1
Pages: 53-62

Molecular analysis of Coagulase Gene in Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains

Masoomeh Zarei [1], Ramezan Ali Ataee [2 *], Ali Mehrabi Tavana [3], Davoud Esmaeili [2], Mahdi Ghorbanalizadgan [4], Mostafa Mahabadi [5]

[1] M.Sc. Student in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[2] Professor in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Applied Microbiology Research Center, System Biology and Poisonings Institute, and Hospital Research Development Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Professor in Medical Microbiology, Faculty of Medicine and Heath Management Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor in Medical Microbiology, Applied Microbiology Research Center, System Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[5] Assistant Professor in Medical Microbiology, Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 22 November 2018 **Accepted:** 31 January 2019

Abstract

Background and Aim: Coagulase enzyme is one of the most important virulence factors of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), which could be used for differentiation of *S. aureus* from other Staphylococcal species. The relationship between the genotype of coagulase and the enterotoxigenic strain of *S. aureus* is unknown. The purpose of this study was to investigate *coa gene* typing in enterotoxigenic strain of *S. aureus.*

Methods: A total of 21 enterotoxigenic *S. aureus* strains were assayed. A specific pair primer for *coa gene* amplification was selected. Gene extraction from the bacterial strain was carried out separately. Then, the *coa gene* amplification by PCR was performed. Using the bioinformatics methods in Silico and comparing PCR products with reference samples in silico, the search for AluI restriction enzyme digestion sites was determined.

Results: The results of *coa* gene amplification showed that only 20 *S. aureus* strains have this genetic element and consist of eight classes of *coa gene* based on their size, ranging from 352 to 1200 bp amplicons. All amplified fragments have fragments restriction enzyme AluI site action except fragment 352 bp which prone to genotyped. The frequency of the *coa* genotype in this study was type I (42.85%), type IV (19%), type II (9.5%) and others (4.76%) respectively. The results of alignment *coa* gene types with enterotoxigenicity showed that the potent enterotoxin producer was related to *coa* gene type II and VI.

Conclusion: The study results indicated that the *coa* gene by primer pairs could have an amplified different size fragment. The comparison finding with references is a simple and accurate method for genotyping of the *S. aureus* isolate and it would be able to determine the type of enterotoxins produced.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Coa* gene, Enterotoxins, PCR, Typing.

*Corresponding author: **Ramezan Ali Ataee**, Email: ataee@bmsu.ac.ir

مجله طب نظامی
دوره ۲۱، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸
صفحات: ۶۲-۵۳

بررسی مولکولی ژن کواگولاز در سویه های *استافیلوکوکوس آرئوس انتروتوکسیژن*

معصومه زارعی[۱]، رمضانعلی عطایی[۲*]، علی مهرابی توانا[۳]، داود اسماعیلی[۲]، مهدی قربانعلی زادگان[۴]، مصطفی مهابادی[۵]

[۱] دانشجوی کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات میکروبشناسی کاربردی و کمیته توسعه تحقیقات بیمارستان بقیه‌الله الاعظم، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۲] استاد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات میکروبشناسی کاربردی و کمیته توسعه تحقیقات بیمارستان بقیه‌الله الاعظم، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۳] استاد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات مدیریت سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۴] استادیار میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات میکروبشناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.
[۵] استادیار میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم کواگولاز یکی از مهمترین فاکتورهای ویرولانس *استافیلوکوکوس آرئوس* می باشد که برای افتراق این باکتری از سایر سویه‌های *استافیلوکوکوس* استفاده شده است. اما رابطه تیپ کواگولازی و سویه انتروتوکسیژنیک در *استافیلوکوکوس آرئوس* ناشناخته است. هدف از این مطالعه، تعیین تیپ ژن کواگولاز (coa gene) در سویه های انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس آرئوس* بوده است.

روش‌ها: در مجموع ۲۱ سویه انتروتوکسیژنیک *استافیلوکوکوس آرئوس* مورد بررسی قرار گرفتند. جفت پرایمر اختصاصی برای تقویت ژن coa انتخاب شد. استخراج ژنوم از باکتری ها به صورت جداگانه انجام شد. سپس، تکثیر ژن coa توسط PCR انجام گردید. با استفاده از روش های بیوانفورماتیک in Silico و مقایسه محصولات PCR با نمونه های رفرانس موجود در in silico جستجوی سایت های برش آنزیم محدودالاثر AluI تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج تکثیر ژن coa نشان داد که تنها ۲۰ سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* دارای این عنصر ژنتیکی هستند که شامل ۸ گروه کواگولازی بودند. اندازه باند تکثیر شده ژن کواگولاز در سویه های مختلف قطعاتی از ۳۵۲ تا ۱۲۰۰ جفت باز را شامل گردید. همه قطعات تکثیر شده به جزء قطعه ۳۵۲ جفت بازی دارای سایت برش آنزیم AluI بودند. فراوانی ژنوتیپ غالب کواگولازی حاصل از این تحقیق عبارت بودند از: به ترتیب، تیپ I (۴۲/۸۵ درصد)، تیپ IV (۱۹ درصد)، تیپ II (۹/۵ درصد) و سایر تیپ ها هر یک (۴/۷۶ درصد). نتیجه همسان سازی ژنوتیپ کواگولازی با توکسین‌زایی سویه ها حاکی از آن بود که تیپ های II و VI کواگولازی قوی ترین تولید کننده های انتروتوکسین هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد، تکثیر ژن کواگولاز با یک جفت پرایمر قادر به تکثیر تیپ های مختلف این ژن با اوزان مولکولی متفاوت می باشد. مقایسه آنها با رفرانس های موجود، روشی ساده و دقیق برای تیپ بندی انتروتوکسیژنیسیتی سویه های *استافیلوکوکوس آرئوس* بر اساس ژنوتیپ کواگولاز می باشد.

کلیدواژه‌ها: *استافیلوکوکوس آرئوس*، ژن کواگولاز، انتروتوکسین، PCR، تایپینگ.

*نویسنده مسئول: **رمضانعلی عطایی**. پست الکترونیک: ataee@bmsu.ac.ir
دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۹/۰۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۱۱

مقدمه

استافیلوکوکوس آرئوس با داشتن انواع فاکتور های ویرولانس و بیماری‌زا یک تهدید مهم در جامعه و نیز در گروه های خاص از جمله نظامیان محسوب شده است (۱). علاوه بر بروز اپیدمی‌های مسمومیت غذایی ناشی از انتروتوکسین‌های این باکتری (۲-۶)، عفونت‌های مخرب بافت‌های نرم و نیز زخم‌ها در مراکز نظامی (۳, ۲)، گسترش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در مراکز نظامی از جمله مقاومت به متی سیلین (۴, ۵)، بیماری‌های التهابی مزمن ناشی از انتروتوکسین‌های با خاصیت سوپرآنتی‌ژنیک این باکتری (۶)، همچنین، تهدید های بیوتروریستی بالقوه ناشی از این باکتری (۷)، تشخیص انتروتوکسین‌زایی احتمالی سویه‌های این باکتری از اهمیت ویژه‌ای برای مدیریت تشخیص، پیشگیری و درمان عفونت‌های مختلف ناشی از این باکتری برخوردار شده است.

از آنجا که علاوه بر انتروتوکسین‌های سوپرآنتی‌ژنیک، آنزیم کواگولاز به عنوان یک منعقد کننده پلاسما، یک عامل مهم ویرولانس و بیماریزایی و افتراق دهنده *استافیلوکوکوس آرئوس* از سایر *استافیلوکوکوس‌ها* می‌باشد (۸). در گذشته *استافیلوکوکوس-های* تولیدکننده کواگولاز بیشتر مورد توجه بودند. ولی امروز استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی نیز مورد توجه جدی قرار گرفته‌اند (۹) با آنکه برخی از تحقیقات اخیر بیماری زایی *استافیلوکوکوس‌های* کواگولاز منفی را گزارش نموده‌اند (۱۰). حتی از مایع نخاع بیماران مبتلا به مننژیت، *استافیلوکوکوس‌های* توکسین زا ولی کواگولاز منفی گزارش شده است (۱۱). همچنین، عفونت‌های پروتز مفصلی ناشی از *استافیلوکوکوس‌های* کواگولاز منفی منتشر شده است (۱۲). ولی معلوم نیست آیا نقص روش‌های مرسوم تشخیص آنزیم کواگولاز بوده که نمی تواند پوشش دهنده همه سویه ها یا عوامل ناشناخته دیگری دخیل است.

افزون بر این‌ها، ظهور مقاومت به متی‌سیلین در برخی از سویه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و یا حتی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* معضلات زیادی را به وجود آورده است (۱۲, ۱۴). در هرحال، توانایی منحصر به فرد *استافیلوکوکوس آرئوس* در ایجاد عفونت‌های قلبی- عروقی، آندوکاردیت، سپتی سمی، بیماری های التهابی و نیز انعقاد پلاسما مشکلات فراوان درمانی را ایجاد کرده است. (۱۵). به دلیل اهمیت نقش کواگولاز در ویرولانس و بیماری‌زایی این باکتری، مطالعات ژنتیکی کواگولاز و شناخت سکانس ژنی آن باعث آن شده است که محققین به طراحی واکسن مبتنی بر کواگولاز متمرکز شوند (۱۶). همچنین، روش‌های مولکولی تشخیص سریع *استافیلوکوکوس* کواگولاز مثبت طراحی و گزارش شده است (۱۷).

همچنین، نقش کواگولاز در تولید بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس آرئوس* مبنای روش‌های درمانی جدید واقع شده است (۱۸). نکته حایز اهمیت آن است که گزارش منتشر شده‌ای نشان داده است که سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی نیز قادر به لخته نمودن پلاسمای خون بوده‌اند (۱۹). با توجه به مطالب فوق، تحقیقات متعددی در خصوص ویژگی‌ها و ساختار ژن کواگولاز منتشر شده است (۲۰). علاوه براین، توانایی تولید انتروتوکسین‌هایی با خاصیت سوپرآنتی‌ژن به ویژه در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید گزارش شده است (۲۱-۲۴). به دلیل طیف گسترده عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس‌ها* و نیز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده در آنها در سال‌های اخیر، محققین بررسی رابطه بین کواگولاز و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها را منتشر کرده‌اند (۲۵). همچنین، به منظور امکان پایش تغییرات ژنتیکی منجر به مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های *استافیلوکوکوس آرئوس* بر اساس تنوع ژن کواگولاز تیپ بندی و تاکنون ۱۰ تیپ ژنتیکی برای کواگولاز تعریف شده است (۲۶).

از بین ده تیپ ژنتیکی کواگولاز دو تیپ شایع یکی تیپ با سکانس ۵۹۵ جفت باز از عفونت پستان‌ها و دیگری با سکانس حاوی ۵۱۴ جفت باز از عفونت های پوستی گزارش شده است (۲۷). این در حالی است که ارتباط تیپ کواگولاز با نوع انتروتوکسین *استافیلوکوکوس* که از اهمیت نظامی ویژه‌ای برخوردار است اطلاعات چندانی در دست نیست.

علاوه بر اهمیت کواگولاز، در سال‌های اخیر نقش سوپرآنی ژن‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* در ایجاد بیماری‌های التهابی از جمله: آرتریت روماتوئید توجه زیادی را به خود جلب نموده است (۲۸). چنانچه، توانایی ایجاد آرتریت انتروتوکسین تیپ A *استافیلوکوکوس آرئوس* گزارش شده است (۲۹) با توجه به این که تنظیم عوامل ویرولانس *استافیلوکوکوس آرئوس* تحت کنترل سیستم تنظیمی agrC/agrA بوده و تولید انتروتوکسین‌ها، همولیزین ها، ادهزین ها و کواگولاز را کنترل می کند.؛ احتمالا بین تولید کواگولاز و انتروتوکسین ارتباط وجود داشته باشد ولی این که کدام تیپ کواگولازی با کدام تیپ انتروتوکسین (سوپرآنتی‌ژن) مرتبط است هنوز بی پاسخ باقی مانده است. لذا، هدف این تحقیق، تیپ بندی سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس براساس ژن کواگولاز که در تحقیق قبل (۳۰) از نظر تولید انتروتوکسین‌های شایع تیپ بندی شده بودند می‌باشد.

روش‌ها

این تحقیق در یک دانشگاه نظامی در شهر تهران و در خلال سال های ۱۳۹۷-۱۳۹۶ به صورت پایان نامه در قالب طرح انجام شده است.

مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت ایرانی سیناکلون خریداری گردید. همچنین، محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت آریا وجد پخش کننده محصولات مرک آلمان خریداری شد.

در یک تحقیق تجربی (Experimental) ۲۱ سویه استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه نظامی در شهر تهران و نیز آزمایشگاه

بیمارستان میلاد در شهر تهران که از نظر تولید انتروتوکسین‌ها (سوپرآنتی‌ژن‌ها) تیپ بنده و به صورت لیوفیلزه نگهداری شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت و استخراج ژنوم

کشت باکتری و استخراج ژنوم: آمپول لیوفیلزه در شرایط آسپتیک باز و با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت استریل شده LB- broth سوسپانسیون گردید؛ ۱۰۰ میکرولیتر آن را به محیط کشت LB- broth تلقیح و ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته به محیط کشت LB- Agar منتقل و به صورت ایزولاسیون کشت داده و در دمای ۳۷ در سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری و رشد کلنی ها، با لوپ استریل سرد شده تعدادی از کلنی‌ها را برداشته و به میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر محلول بافر STE وارد و بطور کامل محلول گردید. سپس ۱۲۵ میکرولیتر محلول۲ درصد SDS و ۲۵۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار به محلول اضافه و با سر و ته کردن (۱۰ بار) کاملاً مخلوط شد. پس از آن بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (g ×۳۰۰۰) شد. در این حالت ژنوم وارد مایع رویی می‌گردد. محلول رویی را به لوله استریل منتقل و بعد از اضافه کردن ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد (یا اتانول خالص ۱۰۰٪) به آرامی مخلوط و به مدت یک ساعت و گاهی تا یک شب در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از آن محلول سانتریفیوژ (به مدت ۵ دقیقه در g ×۱۲۰۰۰ و ۴ درجه سانتیگراد) شد. محلول رویی دور ریخته شد. سپس ته مانده کاملاً خشک گردید. روی ته مانده خشک شده ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ افزوده و پس از ۱ ساعت قرار دادن آن در فریزر مهنای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (به مدت ۵ دقیقه در g ×۱۲۰۰۰ و ۴ درجه سانتیگراد) گردید. مایع رویی را دور ریخته و رسوب بطور کامل خشک گردید. به رسوب حاصل ۵۰ میکرولیتر بافر TE یا آب مقطر استریل اضافه کرده و ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت DNA حاصل اندازه گیری شد و با افزودن بافر TE به آن محلول حاوی ۱۰ نانوگرم در هر میکرولیتر تهیه و در میکروتیوپ های استریل توزیع و نگهداری شدند. یک میکرولیتر از محلول ژنومی حاصل را (به عنوان تمپلیت) به تیوپ‌های مخصوص PCR وارد و در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در موقع لزوم هر یک از تیوپ‌های حاوی ۱ میکرولیتر تمپلیت از فریزر خارج و با تهیه گرادیان از آن جهت انجام PCR استفاده گردید.

انتخاب پرایمر

در این تحقیق از دو جفت پرایمر استفاده شد. یک زوج پرایمر با استفاده از ژن رفرانس کواگولاز موجود در بانک ژن به شماره GenBank: M28521.1 و نرم افزار GeneScript طراحی گردید. زوج پرایمر دوم با بررسی مقالات منتشر شده، پرایمری که بیشتر مورد استفاده محققان قرار گرفته بود انتخاب گردید (جدول ۱) و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید. ترادف این پرایمرها به قرار زیر بود.

همچنین، ضمن بررسی‌های بیوانفورماتیک زوج پرایمرها، با استفاده از نرم افزار آنلاین In Silico کارآیی زوج پرایمرها به طور جداگانه بررسی شدند.

واکنش PCR

واکنش PCR طبق پروتکل ارایه شده در جدول ۱ انجام شد. به منظور بهینه سازی شرایط PCR از گرادیان درجه حرارت (۵۳ الی ۶۳ درجه سانتیگراد)، همچنین، PCR mix با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس Amplicon، ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد ۵ میکرومول، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورز ۵ میکرومول،۱۰ میکرولیتر محلول DNA استخراج شده با گرادیان غلظت (۱۰ الی ۱۰۰ پیکوگرم در میکرولیتر) برای هر یک از نمونه ها به طور جداگانه تهیه گردید. سپس PCR نمونه ها با دستگاه C1000, Thermal Cycler ساخت شرکت Bio- RAD و برنامه دناتوراسیون اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها به تمپلت (آنیلینگ) ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اکستنشن اولیه و نهایی به ترتیب به مدت یک و ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل انجام شد. محصول PCR (۳ میکرولیتر با ۱ میکرولیتر فلورادی) با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز (ولتاژ اولیه ۱۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس با ولتاژ ۷۵ به مدت ۶۰ دقیقه) شد. سپس تحت تابش نور ماورای بنفش (دستگاه ژل داک) مورد بررسی قرار گرفت.

با مقایسه اندازه باندهای حاصل از واکنش فوق، با نتایج PCR مجازی نرم افزار In silico، سکانس قطعات حاصل استخراج و بررسی های بیوانفورماتیکی، تعیین تعداد جایگاه‌های برش آنزیمی تیپ کواگولاز هر یک از سویه ها تعیین و ارتباط آنها با نوع انتروتوکسین تولید شده بررسی و در جدول ۱ ارایه شده است.

نتایج

نتیجه کشت باکتریولوژیک سویه های لیوفیلیزه شده رشد باکتری را در محیط های مایع و نیز جامد نشان داد. بررسی نتایج استخراج ژنومی نشان داد حداقل و حداکثر DNA استخراج شده معادل ۱۰۰ الی ۱۶۵ نانوگرم در میکرولیتر بود که همه نمونه های استخراجی با افزودن بافر TE غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تهیه شد.

بخشی از نتیجه بررسی پرایمر انتخابی و انجام PCR مجازی آن با نرم افزار آنلاین in Silico در شکل-۱ ارایه شده است. نتایج حاکی از آن بود که این پرایمر قادر است از ۶۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس در ۴۶ سویه ژن کواگولاز را تکثیر نماید.

نکته حایز اهمیت آن بود که قطعه تکثیر شده در PCR مجازی در سویه های مختلف اندازه یکسانی نداشتند.

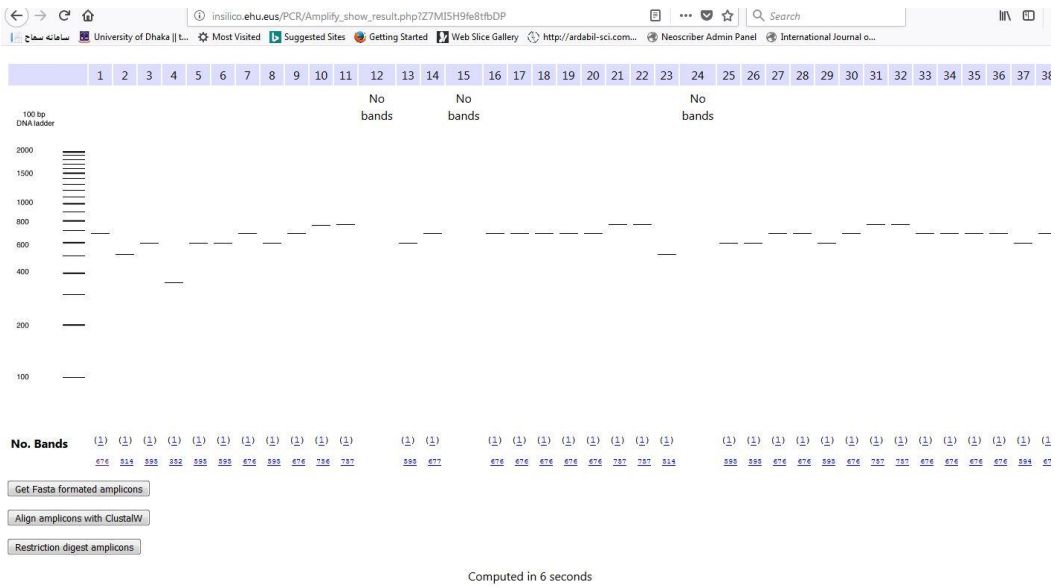
از یافته های مهم این تحقیق ان است که استفاده از ست پرایمر ۱ الگوی تکثیر قطعات مشابه PCR مجازی حاصل گردید (شکل-۲).

در شکل-۲؛ چاهک ۳ و ۵ باند حدود ۵۱۴ جفت باز؛ چاهک ۱۱ استاندارد وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ چاهک ۱۲ باند حدود ۵۹۵ جفت باز؛ چاهک های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۹، ۱۳ ۱۴ و ۱۵ باند حدود ۶۷۶ جفت باز؛ چاهک ۱۰ باند حدود ۷۵۷ جفت باز؛ چاهک ۷ و ۱۳ به ترتیب باندهای ۱۱۰ و ۱۲۰ جفت باز را نشان داده است.

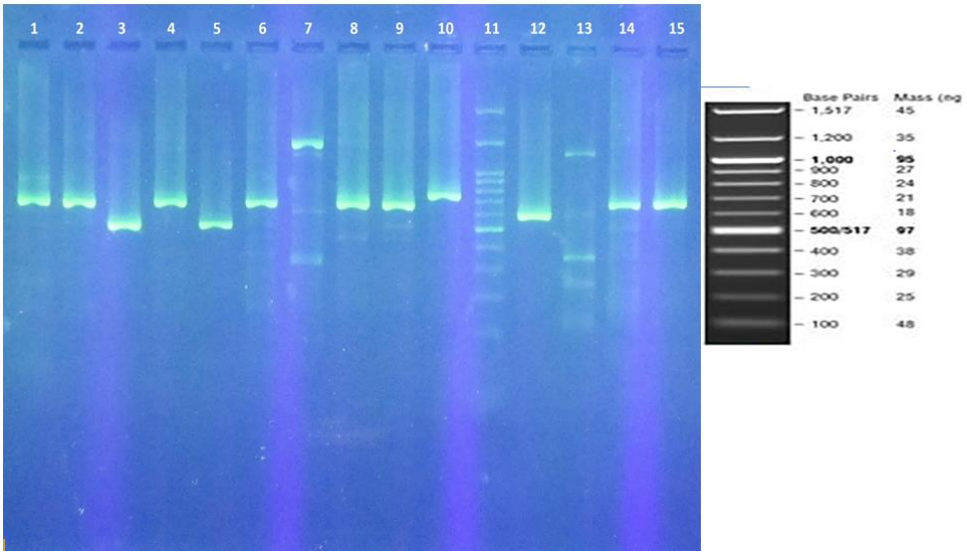
مقایسه نتیجه PCR مجازی با نرم افزار In- Silico با دو ست پرایمر بکار برده شده در این تحقیق، حاکی از آن بود که از ۶۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس، ۱۴ سویه به عنوان کواگولاز منفی و ۴۶ سویه کواگولاز مثبت حاصل گردید. این ۴۶ سویه کواگولاز مثبت در بر دارنده ۷ تیپ ژنتیکی هستند (جدول-۱). در حالی که با ست پرایمر II تنها در ۱۴ سویه از ۶۰ سویه استافیلوکوکوس آرئوس ژن کواگولاز تکثیر شد که در بر دارنده ۸ تیپ بود (جدول-۱). در حالی که در این تحقیق نتیجه استفاده از ست پرایمر I و بررسی ژن کواگولاز در۲۱ سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* انتروتوکسیژن وجود ۱۰ تیپ کواگولازی را نشان داد که در جدول-۱ ارایه شده اند.

چنانچه در جدول-۱ نشان داده شده است. فراوان ترین تیپ کواگولازی در سویه های بررسی شده در این تحقیق تیپ ۱ بوده است (قطعه تکثیر شده ۶۷۶ جفت باز) و بعد از آن تیپ کواگولازی ۴ که با قطعه ۳۵۲ جفت بازی نشان داده شده است.

نتیجه همسان سازی تیپ های کواگولازی بررسی شده در این تحقیق با انتروتوکسیسیتی آنها در جدول-۲ نشان داده شده است.



شکل-۱. نتیجه PCR مجازی با نرم افزار آنلاین in Silico



شکل-۲. الکتروفورز تعدادی از محصول‌های PCR که تکثیر ژن کواگولاز در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس آرئوس را نشان داده است.

یک نتیجه حایز اهمیت آن بود که سویه ۱۱۱/*استافیلوکوکوس آرئوس* تولید کننده انتروتوکسین تیپ C که با تست کواگولاز لوله ای مثبت گزارش شده بود در این تحقیق وجود ژن کواگولاز را نشان نداد.

نتایج تعیین الگوی برش آنزیمی با تعیین و شمارش سایت های برش با آنزیم AluI در جدول-۳ نشان داده شده است. یک یافته مهم این تحقیق آن است که با یک جفت پرایمر در ژنوم هر سویه استافیلوکوکوس آرئوس یک قطعه با طول معین تکثیر شده است که با قطعات تکثیر شده در سویه های دیگر متفاوت است. نکته حایز اهمیت دیکر آن بود که قطعه ۳۵۲ جفت بازی فاقد سایت برش آنزیمی بود. همچنین در IV، VI و VIII قطعات بیش از ۵۰۰ جفت بازی نیز وجود داشت.

جدول-۱. مقایسه PCR مجازی دو ست پرایمر با نتیجه حاصل از ست پرایمر ۱ در این تحقیق ارایه شده است.

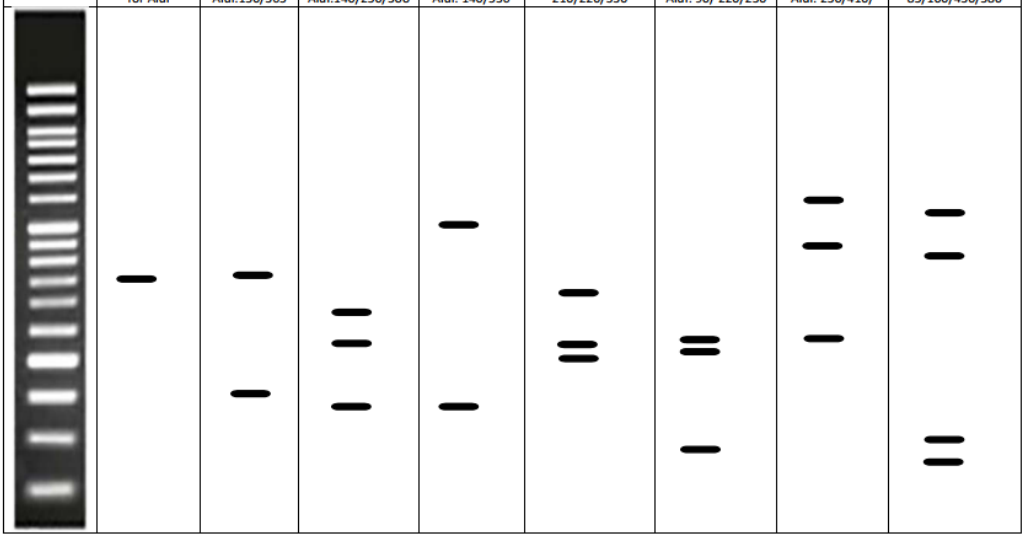
Set primer 1 in- Silico			**Set primer 2 in- Silico**			**Set primer 1 in- Silico In this Study**		
5′-ATA GAG ATG CTG GTA CAG G-3′ 5′-GCT TCC GAT TGT TCG ATG C- 3			5'-TCGCTAGGCGCATTAGCAGTTG-3' 5'-TTGTGTTGGGCGAGCGCCAT-3'			5′-ATA GAG ATG CTG GTA CAG G-3′ 5′-GCT TCC GAT TGT TCG ATG C-3		
Type	Size	No	Type	Size	No	Type	Size	No
1	676	22	1	1671	1	1	676	9
2	514	4	2	1728	5	2	514	2
3	595	10	3	1662	1	3	595	1
4	594	1	4	1914	1	4	-	-
5	352	1	5	1617	1	5	352	4
6	656	1	6	1557	2	6	-	-
7	657	5	7	1833	1	7	657-	1
8	-	-	8	1647	2	8	757	1
9	-	-	9	-	-	9	1100	1
10	-	-	10	-	-	10	1200	1

جدول ۲. همسان سازی تیپ کواگولاز حاصل از این تحقیق و تیپ انتروتوکسینی این سویه ها که در تحقیق قبل تیپ بنده شده بودند را نشان داده است.

شماره	**کد ها**	**نوع انتروتوکسین**	**تیپ کواگولاز/ جفت باز**	**فراوانی تیپ کواگولاز**
۵	۸۵۰۶۵	B	352 bp/ Type IV	19%
۹	۵۰۰۵۹۱	B and C	352 bp/ Type IV	
۱۸	123	C	352 bp/ Type IV	
۲۰	۱۹۲	D	352 bp/ Type IV	
۳	۸۱۱۳۷۵	A++	514 bp/ *Type* II	9.5%
۱۴	۱۳۰	A++	514 bp/ *Type* II	
۱۳	۱۲۸	A	595 bp/Type III	4.76%
۱	۸۳۱۵۲۵	A+	676 bp/ *Type* I	42.85%
۲	۸۵۰۶۵	A+	676 bp/ *Type* I	
۶	۵۰۰۵۹۱	C	676 bp/ *Type* I	
۷	۷۱۱۶	A+	676 bp/ *Type* I	
۸	۱۰۲۷	C	676 bp/ *Type* I	
۱۱	۷۲۰۴۰۹	C	676 bp/ *Type* I	
۱۵	۱۳۹	C	676 bp/ *Type* I	
۲۱	۱۶۶	C	676 bp/ *Type* I	
۴	۳۳۰۵۷۰	E	676 bp/ *Type* I	
۱۰	۷۷۰۲۸۳	E	657 bp/ Type VII	4.76%
۱۶	۱۴۵	E	757 bp/ Type VIII	4.76%
۱۷	۱۵۳	A++ and C++	1100 bp/ Type IX	4.76%
۱۹	۱۶۲	A and C	1200 bp/Type X	4.76%
۱۲	۱۱۱	C	-	4.76%

جدول ۳. نتایج PCR- RFLP مجازی ژنوتیپ های مختلف ژن کواگولاز حاصل در این تحقیق

Type/MW	I	II	III	IV	VII	VIII	VI	VIII
50BP- DNA Ladder	352 bp	514 bp	595 bp	676 bp	756 bp	757 bp	1100 bp	1200 bp
	No Restriction for AluI	Restriction for AluI:150/365	Restriction for AluI:140/250/3oo	Restriction for AluI: 140/536	Restriction for AluI: 210/220/330	Restriction for AluI: 90/ 220/230	Restriction for AluI: 230/410/	Restriction for AluI: 85/100/430/580



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 از جمله: سویه USA 300 شده است که ضمن داشتن قدرت بیماری زایی بالا و نیز مقاومت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک‌ها در سطح جهان گسترش یافته است (۲۷). علاوه بر تهدیدات زیستی ناشی از عفونت ها و نیز انتروتوکسین B این باکتری (۳۱)، آنزیم کواگولاز آن یکی از عوامل مهم ویرولانس بوده و وجود آن در باکتری باعث افتراق آن از سایر *استافیلوکوکوس‌ها* می‌گردد، بنابراین به عنوان یک تست تشخیص بیماریزایی از اهمیت زیادی برخوردار شده است (۳۲). به دلایل نامعلوم پراکندگی سویه های مقاوم به متی سیلین و نیز ونکومایسین از یک طرف (۳۳) و نیز ظهور سویه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی مقاوم به درمان باعث نگرانی های زیادی شده است. زیرا، گزارش کواگولاز مثبت یا منفی مبتنی بر واکنش آنزیماتیک (آزمایش کواگولاز لوله‌ای و اسلایدی با ۹۵ درصد حساسیت و اختصاصیت)، قادر نیست ضمن پوشش همه سویه ها، علت منفی بودن تست را در سویه های جدا شده بیان نماید (۳۴). احتمالاً گزارش کواگولاز منفی به خاطر وجود واریته های مختلف آنزیم و نیز عدم شرایط لازم برای فعالیت آن باشد. تحقیقات اخیر در خصوص پاسخ های ایمنی بیماران مبتلا به استئومیلیت با یا بدون دخالت *استافیلوکوکوس آرئوس* نقش احتمالی کواگولاز را در ایجاد ضایعات استخوانی مطرح کرده است (۳۵). با این حال، دست یابی به جزئیات دقیق نقش این آنزیم و نیز ژنوتیپ مربوطه در ایجاد نکروز استخوانی نیازمند تحقیقات بیشتر می باشد.

بررسی ژن کواگولاز در سویه های مختلف *استافیلوکوکوس* و طبقه بندی آنها احتمالاً ارایه دهنده روش های نوین تفسیر بیماری زایی و روش‌های کنترل آن گردد. در تحقیقی وجود ژن کواگولاز در ۲۸/۱ درصد سویه‌های کواگولاز منفی گزارش شده است (۳۶). به دلیل تنوع آنزیم‌های کواگولاز ممکن است شرایط تولید برخی از آنها متفاوت و نیازمند بررسی بیشتر باشد.

در هر حال، به دلیل اهمیت و طیف وسیع بیماری‌های ناشی از *استافیلوکوکوس آرئوس* به‌ویژه در مراکز بهداشت و درمان نظامی (۳۷)، این آنزیم در سال‌های اخیر به طور وسیعی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است.

با توجه به اهمیت تهدیدهای بالقوه انتروتوکسین های این باکتری از یک طرف و تولید انتروتوکسین های مهلک توسط سویه های کواگولاز منفی در نمونه های بالینی (۳۸) در موارد زیادی شدت بیماری زایی، طیف مقاومت آنتی بیوتیکی و توکسین زایی استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت و منفی گزارش شده است (۳۹, ۴۰). چنانکه در گزارشی فراونی انتروتوکسین تیپ I و عدم وجود ژن های رمز کننده انتروتوکسین های تیپ A و E در بین سویه‌های حامل ژن کواگولاز گزارش شده است (۴۱).

از طرفی توانایی تولید انتروتوکسین در سویه های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی مستلزم اثبات عدم بیان یا عدم وجود ژن فعال کواگولاز در این سویه ها می باشد (۴۲). به این ترتیب، در تحقیقی از بررسی ۲۰۰ سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* ۱۶۱ (۸۰/۵ درصد) سویه ها؛ حامل ژن کواگولاز با سه ژنوتیپ مختلف بودند (۴۳). در حالی که در تحقیق حاضر ۲۱ سویه انتروتوکسی‌ژن استافیلوکوکوس آرئوس با ست پرایمر I، هفت ژنوتیپ کواگولازی را نشان داد.

نتایج این تحقیق حاکی از آن بود که ژنوتیپ IV کواگولازی تولید کننده ضعیف انتروتوکسین های تیپ B، C و D بودند. در حالی که ژنوتیپ کواگولازی II تولید کننده قوی انتروتوکسین تیپ A بودند. همچنین، ژنوتیپ کواگولازی I تولید کننده متوسط

انتروتوکسین A، C و E بودند و ژنوتیپ‌های کواگولازی VII و VIII نیز تولید کننده انتروتوکسین تیپ E بودند.

نکته حایز اهمیت آن بود که ژنوتیپ کواگولازی IX تولید کننده قوی انتروتوکسین های A، و C بود. هر چند این گزارش اولین مورد در این خصوص نیست ولی در نوع خود منحصر به فرد می باشد. زیرا، تمام سویه های مورد بررسی از نمونه های بالینی بودند و بنابراین، با استناد به نتایج این تحقیق می توان وجود ژنهای رمزکننده تیپ های مختلف کواگولازی را با تیپ های مختلف انتروتوکسین که از سوپرآنتی‌ژن های کلاسیک هستند را توضیح داد. این موضوع از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا، تعیین تیپ کواگولازی و ارتباط احتمالی آن با یک انتروتوکسین خاص می تواند نقش اساسی در مدیریت عفونت های استافیلوکوکوسی ارایه نماید. به عبارت دیگر، بر اساس یافته های این تحقیق شاید بتوان با تعیین تیپ کواگولازی در سویه های مختلف *استافیلوکوکوس آرئوس* حتی در سویه های به ظاهر کواگولاز منفی، توکسیژنیسیتی باکتری را پیش‌بینی و از خطرات ناشی از تولید توکسین آن پیشگیری کرد.

نکته حایز اهمیت دیگر آن است که با وجود تعداد کم باکتری، تغییرات گسترده ژنوتیپی در ژن های کواگولاز بررسی شده در این تحقیق حکایت از ظهور سویه های جدید استافیلوکوکوس آرئوس در نمونه های بررسی شده دارد. زیرا، الگوی برش آنزیمی انجام شده مجازی ۸ الگوی ژنتیکی را نشان داد که تاکنون در تحقیقات دیگر گزارش نشده است.

برای مثال، در یک تحقیق منتشر شده، با بررسی و تکثیر ژن کواگولاز در ۸۵ سویه *استافیلوکوکوس آرئوس* مقاوم به متی سیلین موفق به تکثیر ۴ تیپ مختلف کواگولاز (۴ نوع باند) با اندازه های ۵۴۷، ۶۰۳، ۶۶۰ و ۸۷۵ جفت باز بود (۲۹) در حالی که در این تحقیق ۸ نوع باند از ۳۵۲ الی ۱۲۰۰ جفت باز (جدول-۱ و ۲) حاصل گردید. احتمالاً، دلیل این تغییرات وقوع گسترده نوترکیبی های کروموزومی در ژن های کواگولاز ذکر شده باشد (۳۰). همچنین، در تحقیقی دیگر وجود ۴ ژنوتیپ کواگولازی با اندازه های ۵۱۴، ۵۹۵، ۷۵۷ و ۸۰۲ جفت بازی گزارش گردیده است (۱۳) مقایسه نتایج آن با تحقیق حاضر حکایت از تغییرات فراوانی در سویه های حیوانی و انسانی دارد. هر چند در ژنوتیپ های ۵۱۴، ۵۹۵، ۷۵۷ جفت بازی مشترک هستند. هر چند ادامه و توسعه این تحقیق با محدودیت هایی از جمله نبود کیت های تشخیص انتروتوکسین های شایع استافیلوکوکوس همراه بوده ولی نظر به این که در سالهای اخیر دخالت سویه های VBNC *استافیلوکوکوس آرئوس* مطرح شده و به پیچیدگی طبقه بندی فاکتور های بیماری زایی این باکتری افزوده شده است. لذا، انجام تحقیقات پیشرفته ای مبتنی بر بررسی بیان ژنوتیپ های مختلف آنزیم کواگولاز ضروری می‌باشد. این امر می تواند به تعیین هدف برای طراحی واکسن کمک نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد، تکثیر ژن کواگولاز و همسان سازی بیوانفورماتیکی آن با رفرانس های موجود یک روش ساده و دقیق برای تیپ بندی استافیلوکوکوس آرئوس بوده و احتمالاً بتوان از این طریق به شاخص‌های توکسینیژنیسیتی باکتری پی برد. زیرا، تیپ مشخص کواگولازی از تولیدکننده های قوی انتروتوکسین بود. در هر حال، احتمال وجود ارتباط ژنتیکی بین انتروتوکسین و کواگولاز در لوکوس ژنی تنظیم کننده (سیستم agrC/agrA) و ارتباط آنها با بیماری های آرتریت روماتوئید و آسم ممکن است وجود داشته باشد. لذا، در مرحله اول شناسایی تیپ کواگولاز و انتروتوکسین (سوپرآنتی‌ژن کلاسیک) جهت پیشگیری و کنترل بیماری های مذکور حایز اهمیت است.

تشکر و قدردانی: با توجه به این که این مقاله حاصل پایان نامه در قالب طرح کارشناسی ارشد میکروب شناسی بوده که در مورخ ۹۶/۱۲/۱۴ به شماره ۴۴۱ توسط شورای پژوهش دانشگاه به تصویب رسیده است. از راهنمایی‌ها و مشاوره های ارزشمند داوران محترم، کارشناسان و نیز واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان بقیه‌الله(عج) در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد. از همکاری و مساعدت جناب آقای دکتر محمد جواد سلطانپور رئیس آزمایشگاه بیمارستان بقیه‌الله(عج) تشکر و قدردانی می نماییم. همچنین، از رئیس مرکز تحقیقات علوم میکروبی و نیز کارشناسان آزمایشگاه میکروب شناسی تشکر و سپاس گذاری می نماییم. به همین ترتیب از رئیس دانشکده پزشکی استاد محترم جناب آقای دکتر محمد رئیس زاده که با هزینه شخصی یاور این پروژه بوده‌اند قدردانی می گردد.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می نمایند هیچگونه تضاد منافع در مورد مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Aamot HV, Eskonsipo PKJ, Jorgensen SB, Blomfeldt A. Staphylococcus aureus colonization during military service: a prospective cohort study. Clin Microbiol Infect. 2018;24(7):744-8.
2. Washington MA, Agee WA, 3rd, Kajiura L, Staege CM, Uyehara CF, Barnhill JC. An analysis of Staphylococcus aureus infections at a military medical center using the PLEX-ID combined polymerase chain reaction-mass spectrometry system. Mil Med. 2014;179(4):445-50.
3. Webber BJ, Federinko SP, Tchandja JN, Cropper TL, Keller PL. Staphylococcus aureus and other skin

and soft tissue infections among basic military trainees, Lackland Air Force Base, Texas, 2008-2012. MSMR. 2013;20(1):12-5; discussion 5-6.
4. Ko JH, Moon SM. Evaluation of Methicillin-Resistance Rates among Community-associated Staphylococcus aureus Infections in Korean Military Personnel. 2018;33(39):e250.
5. Landrum ML, Neumann C, Cook C, Chukwuma U, Ellis MW, Hospenthal DR, et al. Epidemiology of Staphylococcus aureus blood and skin and soft tissue infections in the US military health system, 2005-2010. JAMA. 2012;308(1):50-9.
6. Spaulding AR, Salgado-Pabón W, Kohler PL, Horswill AR, Leung DYM, Schlievert PM. Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3):422-47.
7. Berger T, Eisenkraft A, Bar-Haim E, Kassirer M, Aran AA, Fogel I. Toxins as biological weapons for terror-characteristics, challenges and medical countermeasures: a mini-review. Disaster Mil Med. 2016;2.
8. Thomer L, Schneewind O, Missiakas D. Multiple ligands of von Willebrand factor-binding protein (vWbp) promote Staphylococcus aureus clot formation in human plasma. The Journal of biological chemistry. 2013;288(39):28283-92.
9. Goetz C, Tremblay YDN, Lamarche D, Blondeau A, Gaudreau AM, Labrie J, et al. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. Journal of dairy science. 2017;100(8):6454-64.
10. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clinical microbiology reviews. 2014;27(4):870-926.
11. Ataee RA, Mehrabi-Tavana A, Izadi M, Hosseini SMJ, Ataee MH. Bacterial meningitis: A new risk factor. Journal of Research in Medical Sciences. 2011;16(2).
12. Gao Z, Du Y, Piao S, Sun J, Li X, Zhou Y. Comparison between the Staphylococci aureus and coagulase-negative staphylococci infected total joint arthroplasty treated by two-stage revision: A retrospective study with two year minimum follow-up. Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association. 2018.
13. Kumar H, Palaha R, Kaur N, Ratnakar WS, Sodi A, Kaur M, et al. Prevalence of multidrug-resistant, coagulase-positive Staphylococcus aureus in nasal carriage, food, wastewater and paper currency in Jalandhar city (north-western), an Indian state of Punjab. Environmental monitoring and assessment. 2015;187(1):4134.
14. Latif M, Usman J, Gilani M, Munir T, Mushtaq M, Anjum R. Coagulase negative staphylococci - a fast emerging threat. JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association. 2015;65(3):283-6.
15. Peetermans M, Verhamme P, Vanassche T. Coagulase Activity by Staphylococcus aureus: A Potential Target for Therapy? Seminars in thrombosis and hemostasis. 2015;41(4):433-44.
16. Pozzi C, Bagnoli F, Rappuoli R. Staphylococcus aureus coagulase R domain, a new evasion mechanism and vaccine target. The Journal of experimental medicine. 2016;213(3):292.
17. Qiao B, Cui JY, Sun L, Yang S, Zhao YL. Cross-priming amplification targeting the coagulase gene for rapid detection of coagulase-positive Staphylococci. Journal of applied microbiology. 2015;119(1):188-95.
18. Zapotoczna M, McCarthy H, Rudkin JK, O'Gara JP, O'Neill E. An Essential Role for Coagulase in Staphylococcus aureus Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device-Related Infections. The Journal of infectious diseases. 2015;212(12):1883-93.
19. Dos Santos DC, Lange CC, Avellar-Costa P, Dos Santos KR, Brito MA, Giambiagi-deMarval M. Staphylococcus chromogenes, a Coagulase-Negative Staphylococcus Species That Can Clot Plasma. Journal of clinical microbiology. 2016;54 (5):1372-5.
20. Javid F, Taku A, Bhat MA, Badroo GA, Mudasir M, Sofi TA. Molecular typing of Staphylococcus aureus based on coagulase gene. Veterinary world. 2018;11(4):423-30.
21. Ataee RA, Hedaiatich M, Mansuor Khanshan R, Ataee MH. Molecular screening of staphylococcal enterotoxin type P encoding gene from clinical isolates. Jundishapur journal of microbiology. 2013;6(5).
22. Ataee RA, Kamali M, Ranjbar R, Karami A, Ghorbani M. Standardization of molecular diagnostic of the entc staphylococcus aureus isolated from human infections and determine its sequence. Journal of Military Medicine. 2012;14(3):226-34.
23. Ataee RA, Karami A, Izadi M, Aghania A, Ataee MH. Molecular screening of staphylococcal enterotoxin B gene in clinical isolates. Cell Journal. 2011;13(3):187-92.
24. Ataee RA, Karami A, Sorouri Zanjani R, Baghery M. Standardization of the molecular method for detection of the ent D in Staphylococcus aureus isolated from human Infections: And sequence Determination. Journal of Zanjan University of Medical Sciences and Health Services. 2012;20(78).
25. Beca N, Bessa LJ, Mendes A, Santos J, Leite-Martins L, Matos AJ, et al. Coagulase-Positive Staphylococcus: Prevalence and Antimicrobial Resistance. Journal of the American Animal Hospital Association. 2015;51(6):365-71.
26. Gonzalez-Dominguez M, Potel C, Seral C, Constenla L, Castillo FJ, Alvarez M. Usefulness of PCR-RFLP coa gene for clonal classification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in tertiary hospitals. Scandinavian journal of infectious diseases. 2014;46(10):719-22.
27. Strauß L, Stegger M. Origin, evolution, and global transmission of community-acquired Staphylococcus aureus ST8. 2017;114(49):E10596-604.
28. Ataee RA, Mohoseni-Moghadam Z, Salimzadeh A, Latifi AM, Ataee MH, Alishiri GH. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in synovial fluid of

rheumatoid arthritis pateints. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2013;7(2):1113-9.
29. Gerlach K, Tomuschat C, Finke R, Staege MS, Brutting C, Brandt J, et al. Experimental Arthritis in the Rat Induced by the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin A. Scandinavian journal of immunology. 2017;85(3):191-6.
30. Aref Aghania, Ramezan Ali Ataee. Cloning and Expression of Staphylococcus aureus Enterotoxin B and Comparative with Native Form. Thesis Submitted to Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran. For the Degree of M.Sc. in Microbial Toxin (2010).
31. Zapor M, Fishbain JT. Aerosolized biologic toxins as agents of warfare and terrorism. Respiratory care clinics of North America. 2004;10(1):111-22.
32. Shahmohammadi S, Sheikh AF, Shahin M, Mir I. Evaluation of antibiotic susceptibility pattern and distribution of coa genes in coagulase negative S. aureus from Ahvaz, Iran. Infectious disorders drug targets. 2018.
33. Liu S, Wang M, Guan W. Vancomycin in the treatment of adult intra-abdominal infections: do we have strong evidences? Infection and drug resistance. 2018;11:2539-43.
34. Tiwari HK, Sapkota D, Sen MR. Evaluation of different tests for detection of Staphylococcus aureus using coagulase (coa) gene PCR as the gold standard. Nepal Medical College journal: NMCJ. 2008;10(2):129
35. Rochford ETJ, Sabate Bresco M, Zeiter S, Kluge K, Poulsson A, Ziegler M, et al. Monitoring immune responses in a mouse model of fracture fixation with and without Staphylococcus aureus osteomyelitis. Bone. 2016;83:82-92.
36. Pagac BB, Reiland RW, Bolesh DT, Swanson DL. Skin lesions in barracks: consider community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection instead of spider bites. Military medicine. 2006;171(9):830-2.
37. Sharma V, Sharma S, Dahiya DK, Khan A, Mathur M, Sharma A. Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenecity, biofilm production, and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus isolated from bovine raw milk in North West India. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2017;16(1):65.
38. Moura TM, Campos FS, d'Azevedo PA, Van Der Sand ST, Franco AC, Frazzon J, et al. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive Staphylococcus isolates from black pudding. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2012;45(5):579-85.
39. Karahan M, Acik MN, Cetinkaya B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis in Turkey. Foodborne pathogens and disease. 2009;6(8):1029-35.
40. Veras JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Dos Santos DA, et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2008;12(4):410-5.
41. Karahan M, Cetinkaya B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. Veterinary journal (London, England: 1997). 2007;174(2):428-31.
42. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. Journal of clinical microbiology. 1998;36(4):1083-9.
43. Watanabe S, Ito T, Sasaki T, Li S, Uchiyama I, Kishii K, et al. Genetic diversity of staphylocoagulase genes (coa): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in Staphylococcus aureus. PloS one. 2009;4(5):e5714.