نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۰۷ تابستان ۱۳۹۴
DOI:10.22034/vj.2015.101273

بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از شیر گاومیش های مبتلا به اورام پستان تحت کلینیکی دراطراف شهرستان ارومیه

• **شهناز کوهستانی**
فارغ التحصیل کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه- ایران
• **عبدالرضا رستگارنیا (نویسنده مسئول)**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه- ایران
• **نقی طاهرطلاتپه**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه- ایران
تاریخ دریافت: بهمن ماه ۹۲ تاریخ پذیرش: مهرماه ۹۳
Email: a.rastegar@iaurmia.ac.ir

چکیده

ورم پستان تحت بالینی به عنوان یکی از بیماری‌های مهم در پرورش دام شیری مطرح می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی خصوصیات فنوتیپی گونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر گاومیش های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی دراطراف شهرستان ارومیه بود. برای این منظور نمونه شیر ۴۸۰ کارتیه متعلق به ۱۲۰ راس گاومیش شیری بطور جداگانه جمع آوری و آزمایش غربالگری با استفاده از آزمایش ورم پستان کالیفرنیائی (CMT) برای تشخیص ورم پستان تحت کلینیکی انجام گردید. روش‌های باکتریولوژی به همراه آزمون‌های بیوشیمیائی جهت جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس در مورد کلیه نمونه ها انجام گرفت. جهت تأئید تشخیص و تعیین تیپ مولکولی، استخراج DNA از تمامی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس انجام گردیده و آزمون PCR نیز به ترتیب توسط پرایمرهای اختصاصی ژن nuc و spa صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل از بررسی خصوصیات کشت و آزمایشات تفریقی بیوشیمیایی در ۷۶ کارتیه تحت آزمایش (۱۵/۸ درصد) آلودگی ناشی از گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس گزارش گردید. استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت ۵ مورد (۶/۵۷ درصد)، از کل سویه‌های استافیلوکوکوس جداسازی شده را به خود اختصاص داد. تمامی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس (۱۰۰درصد) بر اساس آزمایش مولکولی مبتنی بر تکثیر ژن nuc مورد تأئید قرار گرفت. تنها یک باند الگوی متمایز (۱۱۵۰ bp) در بررسی ژن spa از ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس گزارش گردید. بطور کلی نتایج بدست آمده نشان می‌دهد به دلیل بالا بودن میزان آلودگی ناشی از گونه های استافیلوکوکوس در نمونه شیر گاومیش‌سهای اطراف شهرستان ارومیه شناسائی و کنترل استافیلوکوکوس اورئوس در فصول مختلف سال اهمیت به سزائی دارد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس؛ ورم پستان؛ تحت بالینی؛ گاومیش

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 107 pp: 67-74

Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from buffalo subclinical mastitis in suburb of Urmia

By: Kohestani, Sh., Gratuated of Microbiology, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.; Rastegarnia, A. (Corresponding Author) Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.; Taher Talatappeh, N., Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

Received: January 2013 **Accepted: October 2014**

Email: a.rastegar@iaurmia.ac.ir

Subclinical mastitis is one of the most costly diseases of dairy animals. The aim of this study was to evaluation of the phenotypic and genotype characteristics of *Staphylococcus aurous* strains isolated from buffalo milk with subclinical mastitis around the city of Urmia. A total of 480 quarter milk samples were collected from 120 dairy buffaloes and screened for subclinical mastitis by the aid of California Mastitis Test (CMT). In order to isolate *S. aurous* by cultural methods, bacteriological examinations with biochemical tests were done on all samples. For the diagnosis and determining the molecular types, extraction of DNA from all *S. aurous* isolates was performed by PCR as well as by the nuc and spa gene-specific primers were done. According to results of culture characteristics and biochemical tests in 76 quarter under test (15/8%) infections were reported from various species of Staphylococci. Coagulase-positive *Staphylococcus aurous* in 5 cases (6/57%), accounted for the isolation of staphylococci. All isolates of *Staphylococcus aurous* (100%) based on molecular tests based on Nuc gene replication was confirmed. Only a distinct pattern of bands (bp1150) in Spa gene of *S. aurous* isolates were reported. Overall, the results show the high levels of pollution caused by Staphylococcus species in milk samples of buffalo around the city of Uremia, identification and control of seasonal variation in *Staphylococcus aurous* is very important.

Key words: *Staphylococcus aurous*, mastitis, subclinical, buffalo

مقدمه

التهاب پستان توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم های بیماری زا ایجاد می‌شود، اما عفونت‌های پستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس از اهمیت به سزائی برخوردار بوده و در سرتاسر جهان از جمله کشورمان در اثر کاهش تولید و کیفیت شیر و هزینه درمان وغیره به صنعت دامپروری وارد می‌سازد (۲).

طی مطالعات مختلف انجام گرفته مشخص گردیده که استافیلوکوکوس اورئوس همچنان به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در ارتباط با ایجاد اورام پستان تحت‌بالینی و بالینی در گونه گاومیش مطرح می‌باشد (۴). استافیلوکوکوس طیف وسیعی از توکسین‌های پروتئینی و نیز عوامل بیماری‌زائی خارج سلولی تولید می‌کند که به نظر می‌رسد در قدرت بیماری‌زائی باکتری موثر باشد (۱). استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین و از نظر اقتصادی مهم‌ترین عامل ایجاد عفونت‌های داخل پستانی در دام های شیری بوده و عامل ایجاد ۳۰ تا ۴۰ درصد از موارد پستانی گزارش شده است. همچنین استافیلوکوکوس اورئوس مهمترین گونه پاتوژن است که که بوسیله دارا بودن توان ذاتی و توانائی کسب مقاومت نسبت به عوامل وداروهای ضد میکروبی به یکی از نگرانی‌های عمده سلامت عمومی تبدیل شده است (۱۲).

گونه‌های استافیلوکوکوس مسبب ایجاد اورام پستان در گونه‌های دام‌های اهلی به استافیلوکوکوس‌های کواگولاز مثبت (Coagulase positive staphylococcus) و نیز گونه‌های استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (Coagulase negative staphylococcus) طبقه‌بندی می شوند، گونه های اخیر یعنی (CNS) مکررا باعث عفونت‌های داخل پستانی گاو و گاومیش حتی در گله های شیری مدرن می شوند. این باکتری ها از نمونه های شیر در بسیاری از کشورها قابل جداسازی می باشند. استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از عوامل پاتوژن مسری در ایجاد اورام پستان تحت کلینیکی در گاومیش مد نظر می باشد (۱۷,۹). امروزه برای اطمینان از وجود باکتری در شیر و نیز اطمینان بیشتر از وجود ترشحات عفونی و سلول های عفونی در شیر، آزمایشات غربالگری نظیر تست کالیفرنیایی ورم پستان (CMT) و شمارش سلول های سوماتیک (SCC) در حجم مشخصی از شیر صورت می گیرد(۵). اورام پستانی ناشی از استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (CNS) باعث افزایش تعداد سلول های سوماتیک (SCC) درکارتیه های عفونی شده و برخی از محققان معتقدند که عفونت های پستانی ناشی از CNSها به نسبت کمتری ناشی از سایر کوکسی‌های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس می‌باشد (۱۶).

استافیلوکوکوس اورئوس طیف گستردهای از عوامل حدت از قبیل کواگولاز، همولیزین و انواع آنتروتوکسین‌ها را تولید می کند که این تنوع به دلیل توانائی این باکتری برای تکثیر و ایجاد عفونت در میزبان های مختلف می‌باشد (۱۳). در بررسی ژنوتیپ سویه های جداشده استافیلوکوکوس به دلیل نقشی که در تمایز ایزوله ها دارد در ردیابی منشأ عفونت و کنترل آلودگی های ناشی از این باکتری می تواند کاربرد به سزائی داشته باشد. ژن spa یکی از این عوامل متمایز کننده است که دارای ناحیه پلی مورفیسم x توالی کوتاه می باشد، که در گونه های مختلف الگوی متفاوتی از این ژن شناسائی شده است. این ژن کد کننده پروتئین A می‌باشد که از جمله پروتئین‌های سطحی استافیلوکوکوس می‌باشد. این پروتئین علاوه بر اینکه فاکتور ویرولانسی باکتری محسوب می‌شود از آن جهت تعیین تیپ اختصاصی استافیلوکوکوس نیز استفاده می‌شود (۱). Aires-de-sousa و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که تقریبا تمامی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه شیر گونه های اهلی نظیر میش، بز، گاو و نیز گاومیش توان تولید انتروتوکسین‌های A و D را داشتند، طوری که در ۶۳ درصد از سویه‌های جدا شده ژن تولید انتروتوکسین A با استفاده از تفکیک ژل الکتروفورز تائید گردید (۳).

هدف از انجام این تحقیق بررسی میزان شیوع اورام پستان تحت بالینی ناشی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت از شیر گاومیش های مبتلا به اورام پستان تحت بالینی بر اساس آزمایش غربالگری ورم پستان کالیفرنیائی در گاومیش‌های سنتی اطراف شهرستان ارومیه و بررسی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی، تنوع و توزیع ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از محیط های کشت کارتیه های عفونی بر مبنای بررسی سکانس دو ژن nuc و نیز spa در آزمایش واکنش زنجیر پلی مراز (PCR) بود.

مواد و روش کار

روش نمونه گیری و کشت

در این تحقیق با مراجعه به دامداری های اطراف شهرستان ارومیه در طی دو فصول زمستان و بهار سال ۹۱-۹۲ در مجموع از ۱۲۰ راس گاومیش های شیری که در شرایط نیمه صنعتی نگهداری می گردید، نمونه گیری انجام گردید. در این راستا به دنبال انجام آزمایش غربالگری با استفاده از آزمایش ورم پستان کالیفرنیائی (CMT) با رعایت اصول دقیق بهداشتی به صورت جداگانه اقدام به اخذ نمونه شیر در ویال های درپوش دار استریل از هر کارتیه دام جهت انتقال به آزمایشگاه در داخل کلمن یخ خشک گردید. مقدار ۳ میلی لیتر از نمونه جمع آوری شده بر روی محیط کشت بر روی آگار خوندار حاوی ۰/۵ درصد خون گوسفند کشت گردید. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، نگهداری گردید (۲).

شناسائی گونه های استافیلوکوکوس بر اساس رنگ آمیزی گرم، همولیز و خصوصیات بیوشیمیایی صورت گردید(۲). سایر آزمون های بیوشیمیائی نظیر تست کاتالاز، ترمونوکلئاز، MR-VP، کواگولاز، تست نیترات به نیتریت، تولید استون و اکسیداز، مقاومت نسبت به نوبیوسین، تخمیر قندهای نظیر مانیتول، رافینوز، زایلوز، ساکارز و لاکتوز در شرایط هوازی و همچنین تخمیر بی هوازی قندهائی نظیر مانیتول و گلوکز استفاده گردید(۳).

پرگنه های به قطر بیش از ۴ میلی متر به صورت صاف، براق و با رنگ زرد طلائی با منطقه همولیز دوتائی به عنوان پرگنه های مشکوک به استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شدند. شناسائی استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس خصوصیات همولیزی، مورفولوژی کلنی ها، آزمون کوکواگولاز، تولید DNase، و ایجاد کلنی های زرد رنگ مانیتول مثبت در محیط مانیتول سالت آگار صورت گرفت (۲). مقاومت میکروبی تمامی گونه های استافیلوکوکوس جداشده نسبت به برخی از آنتی بیوتیک های رایج و در دسترس نظیر پلی میکسین B، نوبیوسین، فورازولیدون و باسیتراسین در محیط کشت مولرهینتون انجام گرفت. در نهایت جهت تشخیص نهائی و بررسی خصوصیات ژنوتیپی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از محیط های کشت آزمایش واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) مورد استفاده قرار گرفت (۱،۳).

استخراج DNA و آزمایش PCR برای تشخیص نهائی استافیلوکوکوس اورئوس

برای استخراج DNA از کیت استخراج ژنومی فرمنتاز (شرکت سیناژن fermentas) و از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI استفاده شد و برای انجام آزمایش زنجیره های پلی مراز نیز از جفت پرایمر اختصاصی بر مبنای تکثیر ژن nuc مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

primer 1: 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3

primer 2: 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3

واکنش PCR شامل: (10X 6 µl Buffer) (10 mM ؛ 1µl) (dNTPs؛ (50 mM ((5 µl ،MgCl2, 2. (Template DNA 2 µl (from BHI medium ؛ 1 µl) Enzyme (Taq DNA polymerase) (5U/µl؛ از هر پرایمر ۱ µl؛ آب دیونیزه ۳۶. ۵ µl می‌باشد که حجم نهائی مجموعه برابر با ۴۰ میکرولیترو می باشد. مراحل حرارتی برای انجام PCR شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون اولیه، ۴۰ سیکل شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون در سیکل ها، یک دقیقه در ۵۵ درجه ساتی گراد جهت اتصال پرایمر ها، یک دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد برای تکثیر قطعه هدف و در نهایت بسط نهائی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد است. ۵ میکرولیتر از محصول PCR در آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری و پس از انجام الکتروفورز به مدت حدود ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۷۵، زیر اشعه ماورای بنفش عکس برداری شد. برای نشان دادن قطعات تکثیری از نشانگر با اندازه ۱۰۰ bp تولیدی شرکت فرمنتاز استفاده شد.

تعیین تیپ مولکولی ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده بر اساس ژن spa

برای استخراج DNA از کیت فرمنتاز (شرکت سیناژن fermentas)، استفاده گردید. برای انجام آزمایش زنجیره های پلی مراز نیز از جفت پرایمر اختصاصی بر مبنای سکانس ژن spa مورد استفاده قرار گرفت(۳).

primer 1: 5- ATCTGGTGGCGTAACACCTG-3

primer 2: 5- C GCTGCACCTAACGCTAATG-3

واکنش PCR در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر شامل: (۱۰X Buffer) ۶ µl (dNTPs؛ ۱µl) (۱۰ mM؛ MgCl۲, ۲. ۵ µl ((۵۰ mM؛ Template (DNA 2 µl (from BHI medium)؛ 5U/µl) Enzyme (Taq DNA poly-

merase) 1 µl؛ از هر پرایمر ۱ µl ؛ آب دیونیزه ۳۶/۵ µl می باشد که حجم نهائی مجموعه برابر با ۴۰ میکرو لیتر و مراحل حرارتی برای انجام PCR شامل ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون اولیه، ۴۰ سیکل شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد برای دناتوراسیون در سیکل ها، یک دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمرها، دو دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد برای تکثیر قطعه هدف و در نهایت بسط نهائی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد است. ۵ میکرولیتر از محصول PCR در آگاروز ۱/۵ درصد بارگذاری و پس از انجام الکتروفورز به مدت حدود ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۷۵، زیر اشعه ماورای بنفش عکس برداری شد. برای نشان دادن قطعات تکثیری از نشانگر با اندازه ۱۰۰ bp تولیدی شرکت فرمنتاز استفاده شد. در نهایت محصول PCR روی ژل آگار یک درصد طبق روش بالا الکتروفورز شد. در نهایت حساسیت میکروبی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس در تست آنتی بیوگرام بر اساس روش استاندارد توصیفی توسط کارت وکول (۱۹۹۰) مورد بررسی قرار گرفت(۶). همچنین اطلاعات بدست آمده در خصوص فراوانی درصد کارتیه های عفونی و جدایه های استافیلوکوکوس با استفاده از نسخه پانزدهم نرم افزار spss وآزمون مربع کای انجام گرفت. سطح معنی داری روی ($p < ۰/۰۵$) ۵ مد نظر قرار داده شد.

نتایج

فراوانی کارتیه و دام های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی

از ۱۲۰ راس گاومیش شیری تحت مطالعه که نمونه شیر آن ها مورد بررسی قرار گرفت، ۲۵ راس (۲۰/۸ درصد)، مبتلا به ورم پستان تحت بالینی تشخیص داده شد. بر اساس نتایج آزمایش ورم پستان کالیفرنیائی(CMT)، ۸۳ کارتیه از مجموع ۴۸۰ کارتیه تحت آزمایش (۱۷/۳ درصد) مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بود. بر اساس نتایج حاصل از بررسی خصوصیات کشت و آزمایشات بیوشیمیایی در ۷۶ کارتیه از مجموع ۴۸۰ کارتیه تحت آزمایش (۱۵/۸ درصد) آلودگی ناشی از گونه های مختلف استافیلوکوکوس گزارش گردید. در این راستا استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در ۵ مورد (۶/۵۷ درصد)، از کل سویه های استافیلو کوکوس جدا سازی شده از اورام پستانی تحت کلنیکی را به خود اختصاص داد(جدول ۱).

شدت نتایج آزمایش ورم پستان کالیفرنیائی (CMT) برای کارتیه های مبتلا به اورام پستانی تحت کلنیکی ناشی از گونه های مختلف استافیلوکوکوس به تفکیک ۵۱/۳ درصد (±)۵ ؛ ۷/ ۴۰درصد (+)CMT؛ ۱۴/۴درصد (۲+)CMT و ۷/۸۹ درصد CMT (۳+) و برای استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۶۰، ۲۰ و ۲۰ درصد برای موارد (+) CMT؛ (۲+)CMT و CMT (۳+) گزارش گردید. درصد کارتیه های عفونی راست جلویی(RA) و راست عقبی (RB) و چپ جلوی(LA) و چپ عقبی (LB) گاومیش های تحت آزمایش نیز به ترتیب ۳۰/۷۸، ۲۰/۲۸، ۲۱/۷ و ۱۹/۲۳ درصد گزارش گردید (جدول ۱).

عمده گونه های استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت جدا سازی شده از نمونه شیر های مبتلا به اورام پستان تحت کلینیکی شامل استافیلوکوکوس اورئوس ۵ مورد (۶/۵۷ درصد)، استافیلوکوکوس اینترمدیوس ۱۰ مورد (۱/۳۲ درصد)، استافیلوکوکوس هایکوس ۱۱ مورد (۱۴/۵۱ درصد) و گونه های استافیلو کوکوس کواگولاز منفی نیز شامل استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۲۵مورد (۳۲/۸۷ درصد)، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس ۹ مورد(۹/۲۱ درصد)، استافیلوکوکوس لنتوس ۷ مورد (۹/۲۱ درصد)، استافیلوکوکوس سیمولانس ۵ مورد (۶/۵۷ درصد)، استافیلوکوکوس کوروموژنز ۳ مورد (۳/۹۵ درصد) گزارش گردید (جدول ۲)، ($p < ۰/۰۵$).

همه سویه های استافیلوکوکوس جداسازی شده نسبت به فورازولیدون حساس و نسبت به باسیتراسین مقاوم بودند. استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (۱۰درصد)، اینترمدیوس (۸۵/۵ درصد)، ساپروفیتیکوس (۸۱/۱ درصد) و هایکوس و لنتوس(۹۲ درصد) نسبت به نووبیوسین مقاومت نشان دادند. مقاومت نسبت به پلی میکسین برای سویه های استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (۱۴/۲ درصد)، هایکوس (۹۱/۰۹ درصد) و برای سویه های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و نیز اینترمدیوس نیز (۱۰۰ درصد) گزارش گردید(جدول ۳).

نتایج شناسائی استافیلوکوکوس اورئوس با روش PCR:

از مجموع ۵ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه های مورد نظر که بر اساس روش کشت و تست های بیوشیمیائی تفریقی مثبت تشخیص داده شده اند، همگی (۱۰۰درصد) با نظر گرفتن آغازگرها و

جدول۱- فراوانی و درصد کارتیه های مبتلا به ورم پستان تحت کلینیکی ناشی از سویه های استافیلوکوکوس براساس شدت واکنش در آزمایش CMT

CMT	استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (CNS)*		استافیلوکوکوس اورئوس	
	فراوانی (تعداد)	فراوانی نسبی (درصد)	فراوانی (تعداد)	فراوانی نسبی (درصد)
جزئی(±)	۳۴	۴۴/۷	-	-
+۱	۲۵	۳۲/۹	۳	۶۰
+۲	۱۱	۱۴/۶	۱	۲۰
+۳	۶	۷/۸۹	۱	۲۰
تعداد کل	۷۶	۱۰۰	۵	۱۰۰

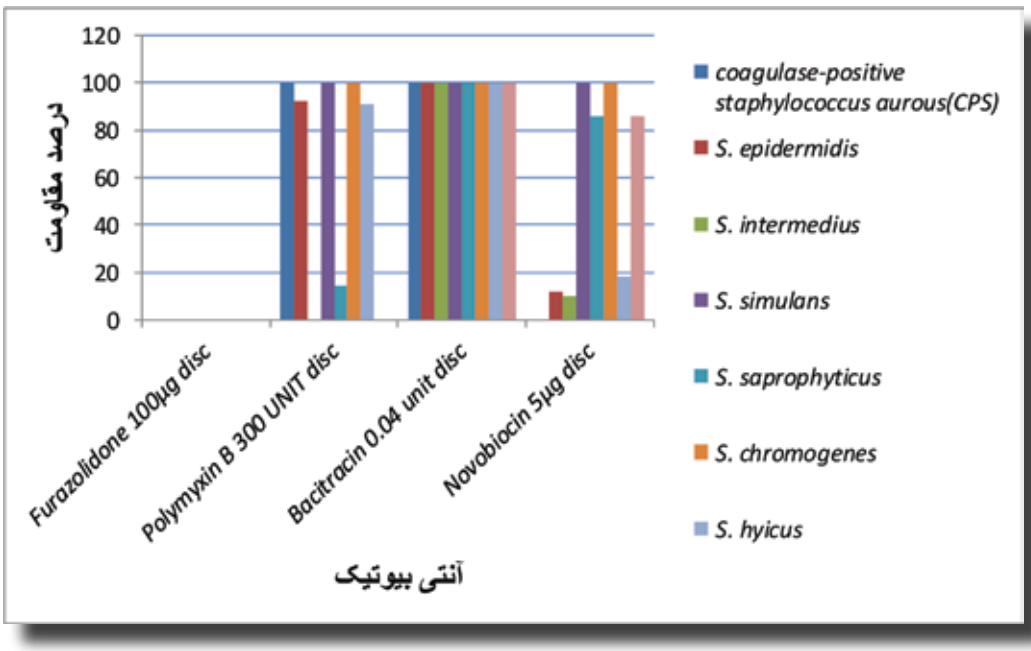
*(Coagulase negative staphylococcus)

جدول۲- فراوانی ودرصد گونه های استافیلوکوکوس جدا شده از شیر گاومیش‌های مبتلا به اورام پستان تحت کلینیکی بر حسب خصوصیات کشت و تست های تفریقی بیوشیمیائی

گونه استافیلوکوکوس	فروانی تعداد	فراوانی نسبی (درصد)
استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت *(CPS)		
استافیلوکوکوس اورئوس	۵	۶/۵۷
استافیلوکوکوس اینترمدیوس	۱۰	۱۳/۲
استافیلوکوکوس هایکوس	۱۱	۱۴/۵
استافیلوکوکوس کواگولاز منفی (CNS)**		
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۲۵	۳۲/۸
استافیلوکوکوس ساپروفیتوس	۷	۹/۲۱
استافیلوکوکوس لنتوس	۷	۹/۲۱
استافیلوکوکوس همولیتیکوس	۱	۱/۳۲
استافیلوکوکوس کروموزنس	۳	۳/۹۵
استافیلوکوکوس سیمولانس	۵	۶/۵۷
استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت(CPS) ومنفی (CNS)		
استافیلوکوکوس اورئوس + اپیدرمیدیس	۲	۲/۶۳
تعداد کل	۷۶	۱۰۰

* (Coagulase negative staphylococcus), **(Coagulase positive staphylococcus)

جدول۳ - توزیع درصد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های استافیلوکوکوس جداسازی شده از کارتیه های مبتلا به اورام پستان تحت کلینیکی در روش دیسک آگار دیفوژیون.



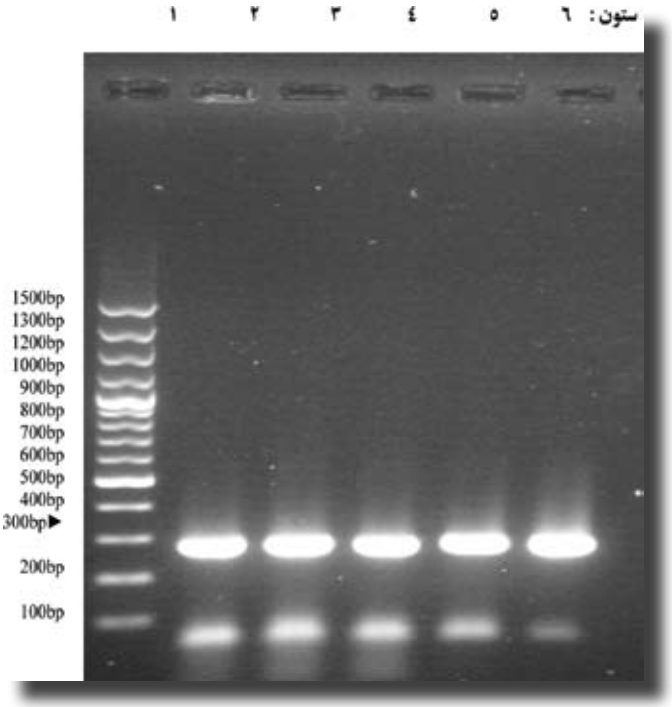
تکثیر قطعاتی به اندازه ۲۷۵ جفت نوکلئوتید بر مبنای سکانس ژن nuc در واکنش زنجیره ای پلیمراز به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس مثبت تشخیص و مورد تأئید قرار گرفت (شکل۱). بررسی ژن spa در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس های جداشده از نمونه های کشت اورام پستان تحت کلنیکی، تنها یک الگوی مختلف از این ژن را نشان داد که با فراوانی ۱۰۰ درصد مربوط به spa، (۱۱۵۰bp) بود. (شکل۲).

بحث و نتیجه گیری

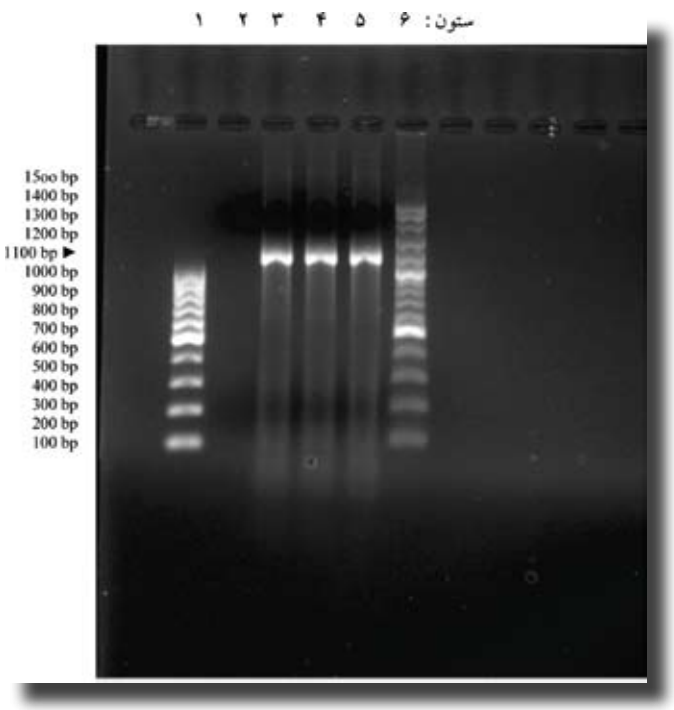
ورم پستان امروزه یکی از بیماری های پرهزینه در صنعت پرورش گاو میش شیری نیز محسوب می شود. با اینکه گاومیش از قدیم به عنوان یک حیوان با حساسیت کم نسبت به ورم پستان در مقایسه با گاو شناخته شده است. معهذا برخی از محققین فراوانی وقوع ورم پستان برای هردو گونه را به یک نسبت گزارش نمودند (۱۸).

میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی دربررسی محققین مختلف در کشور های که پرورش گاومیش در آن ها متداول می باشد از ۴/۷ الی ۲۱/۳ درصد متفاوت گزارش گردیده است (۱۸,۷). در مطالعه حاضر نیز میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در گاومیش های اطراف منطقه ارومیه ۲۰/۸ درصد گزارش گردید که به نظر می رسد با نتایج محققین فوق همخوانی کامل دارد. معهذا در یک بررسی انجام گرفته توسط Ali و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان شیوع اورام پستان تحت کلینیکی در گاومیش های ناحیه پنجاب در کشور پاکستان تا حدود ۴۴ درصد نیز گزارش شده است که بیشترین میزان فراوانی در دام های نگهداری شده در بسترهای تنگ و سنتی (۵۸ درصد) و کمترین میزان (۳۲ درصد) در گله های با شرایط بهداشتی خوب بوده است (۴).

نتایج بدست آمده نشان می دهد گونه های استافیلوکوکوس نقش به سزائی در ایجاد اورام پستان تحت کلینیکی گاومیش های شیری اطراف شهرستان ارومیه دارد. بر اساس نتایج حاصل از بررسی خصوصیات کشت و آزمایشات بیوشیمیایی (۱۵/۸ درصد) آلودگی کل کارتیه های عفونی ناشی از گونه های مختلف استافیلوکوکوس بوده است. در این راستا از کل سویه های استافیلوکوکوس جداسازی شده استافیلوکوکوس اورئوس ۶/۵۷ درصد، کواگولاز منفی ۹۰/۸ درصد و برای هر دو موارد استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی و کواگولاز مثبت (CNS+CPS) ، ۲/۶۳ در صد گزارش گردید. در یک بررسی مشابه انجام گرفته توسط Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بر روی نمونه شیر ۱۳۷ رأس گاومیش شیری در کشور برزیل صورت گرفت نشان داد در مجموع تنها ۱۰/۸ درصد از علل ایجاد اورام پستان تحت کلینیکی ناشی از گونه های مختلف استافیلوکوکوس بوده که در این میان ۱۱/۱ درصد برای استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت(CPS)، ۸۳/۳ درصد برای استافیلوکوکوهای کواگولاز منفی (CNS) و ۵/۶ در صد برای هر دو موارد استافیلوکوکوس های کواگولاز منفی و کواگولاز مثبت (CNS+CPS) مثبت گزارش گردید(۱۴). معهذا در گزارش برخی از محققین در سایر مناطق درصد آلودگی های باکتریایی ناشی از گونه های استافیلوکوکوس اورئوس در ایجاد اورام پستان تحت کلنیکی



شکل ۱- الگوی الکتروفورز ژن nuc در استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه های اورام پستان تحت کلنیکی در گاومیش، ستون۱- مارکر (plus۱۰۰)، (شرکت فرمنتاز)، ستون۲- کنترل مثبت، ستون ۳،۵،۴و۶- نمونه های مثبت باند های به اندازه، (۲۷۵ bp)



شکل۲- الگوی الکتروفورز ژن spa در استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه های اورام پستان تحت کلنیکی در گاومیش. ستون۱- مارکر (plus۱۰۰)، (شرکت فرمنتاز)، ستون۲- کنترل منفی، ستون۳- کنترل مثبت، ستون ۴ و ۵- نمونه مثبت، باندهای به اندازه (bp ۱۱۵۰)، ستون۶- DNA مارکر (plus۱۰۰)، (شرکت فرمنتاز).

گاومیش های شیری بسیار بالا و از ۲۸/۳۲ الی ۳۲/۵ درصد متفاوت نیز گزارش شده است(۱۱, ۹, ۱). در تحقیق حاضر میزان بروز ورم پستان تحت کلنیکی در کارتیه های قدامی گاومیش های تحت بررسی بیشتر از کارتیه های خلفی بود که با نتایج سایر محققین همخوانی کامل دارد. طوری که در بررسی Saleem و همکاران در سال ۲۰۱۱ میزان بروز ورم پستان تحت کلنیکی در کارتیه چپ جلوئی، چپ عقبی، راست جلوئی، راست عقبی گاومیش های تحت بررسی را به ترتیب ۴۷/۲ درصد، ۱۱/۳۶درصد، ۳۶/۳۶درصد، ۴/۵۴درصد، گزارش گردید(۱۸).

در تحقیق حاضر از روش آزمایش غربالگری ورم پستان کالیفرنیائی برای تشخیص ورم پستان تحت کلنیکی در گاومیش استفاده گردید. تمامی گونه های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده در تحقیق حاضر که بر اساس آزمایشCMT و کشت شناسائی گردید، بر اساس نتایج نهائی آزمایش PCR بر اساس سکانس ژن nuc نیز مثبت بود که نشان از حساسیت بالائی روش CMT و نیز کشت برای تشخیص گونه استافیلوکوکوس اورئوس در گاومیش دارد. در بررسی انجام شده در ارتباط با علل شیوع اورم پستانی تحت بالینی و ارتباط آن با شمارش سلول های سوماتیک شیر در گاومیش های آذری مشخص شده که آزمایش ورم پستان کالیفرنیائی (CMT) دارای حساسیت و ویژگی قابل قبول برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی در گاومیش دارد(۱۹). در بررسی Dhakal و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی گاومیش های نژاد مورا در کشور هند، میزان سلول های سوماتیک بالای ۲۰۰ هزار در هر میلی لیتر شیر به عنوان پایه برای ایجاد ورم پستان تحت کلینیکی مورد تائید قرار گرفت(۷).

مقایسه انواع روش های کشت میکروبی PCR و آزمایش کالیفرنیایی ورم پستان (CMT) برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی ناشی از استافیلوکوکوس و استرپتو کوکوس در گاو نشان داد که CMT در مقایسه با PCR حساسیت کافی را برای تشخیص استرپتوکوکوس ها را نداشته ولی برای گونه های استافیلوکوکوس کاملا مفید بوده است(۱۰).

نتایج حاصل از بررسی ژن spa در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جداشده از نمونه های کشت اورام پستان تحت کلنیکی، تنها یک الگو از این ژن را به صورت تکثیر قطعاتی به اندازه باند (1150 bp) در واکنش زنجیره ای پلیمراز نشان داد. این ژن کد کننده پروتئین A می باشد که از جمله پروتئن های سطحی استافیلوکوکوس اورئوس بوده که علاوه بر اینکه فاکتور ویرولانسی باکتری محسوب می شود جهت تعیین تیپ اختصاصی استافیلوکوکوس نیز استفاده می شود (۳). همچنین در یک بررسی مشابه انجام گرفته توسط Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۱ تمامی گونه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از شیر گاومیش های مبتلا به اورام پستان تحت کلنیکی در گاو میش بر اساس استفاده از کیت تست آگلوتیناسیون لاتکس معکوس حداقل توان تولید یک نوع آنتروتوکسین اختصاصی (A,B,C,D) ونیز توکسین شوک TSST-۱ را دارند (۱۴).

در تحقیق حاضر ۱۰۰ درصد از گونه های استافیلوکوکوس جدا شده نسبت به نووبیوسین و فورازولیدون حساس و نسبت به باسیتراسین و پلی میکسین B مقاومت نشان دادند(جدول۳). در یک بررسی مشابه انجام گرفته توسط Oliveira و همکاران در سال ۲۰۱۱ تمامی ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده نسبت به متی سیلین، آمپی سیلین و کلاونیک اسید، حساس بودند در حالی که نسبت به آمپی سیلین، پنی سیلین و اکساسیلین مقاوم بودند (۱۵). مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین، اریترومایسین، تری متوپریم، مترونیدازول ونیز فلوروفنیکول علاوه بر آنتی بیوتیک های یادشده درگونه استافیلوکوکوس جدا شده از شیر گاومیش های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی گزارش گردیده است (۱۱, ۸).

به طور کلی نتایج به دست آمده نشان می دهد گونه های مختلف عوامل پاتوژن و غیر پاتوژن باکتری استافیلوکوکوس شامل استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت، استافیلو کوکوس کواگولاز منفی نظیر استافیلوکوکوس اینتر مدیوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، استافیلوکوکوس هایکوس، استافیلوکوکوس لنتوس، استافیلوکوکوس سیمولانس، استافیلوکوکوس کوروموژنز از شیر گاومیش های مبتلا به اورام پستان تحت کلینیکی قابل جداسازی می باشد. دلیل بالا بودن میزان آلودگی ناشی از گونه های استافیلوکوکوس در نمونه شیر گاومیش های اطراف شهرستان ارومیه شناسائی و کنترل استافیلوکوکوس اورئوس در فصول مختلف سال اهمیت به سزائی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات بی دریغ گروه پاتوبیولوژی به خصوص مسئول محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

1. Afrough P, Pourmand MR, Zeinalinia N, Yousefi M, Abdossamadi Z, Yazdchi SB. (2012). Molecular Typing of Clinical and Nasal Carriage Isolates of *Staphylococcus aureus* by spa Gene Patterns. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences.;22(94):27-34.

2. Ahmady M, Kazemi S. (2012). Detection of the enterotoxigenic genes (sei, sej) in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran. Comparative Clinical Pathology. (DOI 10.1007/s00580-012-1460-3):1-6.

3. Aires-de-Sousa M, Parente CE, Vieira-da-Motta O, Bonna IC, Silva DA, de Lencastre H. (2007). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. Applied and environmental microbiology.;73(12):3845-9.

4. Ali M, Ahmad M, Muhammad K, Anjum A. (2011). Prevalence of sub clinical mastitis in dairy buffaloes of Punjab, Pakistan. Okara.;150(63):42

5. Atyabi N, Vodjgani M, Gharagozloo F, Bahonar A. (2006). Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Tehran. Iranian Journal of Veterinary Research. 7(3 (Ser. 16)):76-9.

6. Carter GR, Cole Jr JR. (1990). Diagnostic procedure in veteri-

nary bacteriology and mycology: Academic Press london.
7. Dhakal I. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. (2006). Journal of Veterinary Medicine, Series B.;53(2):81-6.
8. De Medeiros ES, França CA, Krewer CdC, Peixoto RdM, de Souza Júnior AF, Cavalcante MB, et al. (2011). Antimicrobial resistance of Staphylococcus spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. ;23(4):793-6.
9.Fagiolo A, Lai O. Mastitis in buffalo. (2010).Italian Journal of Animal Science. 6(2s):200-6.
10. Ghorbanpour M, Seyfiabad S, Moatamedi H, Jamshidian M, Gouraninezhad S. (2007). Comparsion of microbial culture, PCR and CMT for diagnosis of dairy cattle,s staphylococal and subclinical mastitis. Scientific-Research Iranian Veterinary Journal..3,1(14):63-70.
11.Maniruzzaman M, Khan M, Amin M, Paul A, Islam M. (2010). Isolation and identifaction of bacterial flora from milk of apparently health buffalo-cows. Int J BioRes.;1(3):13-6.
12. Mirzaei H, Javadi A, Farajli M, Shah-Mohammadi A, Monadi A, Barzegar A. (2012). Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. Journal of Veterinary Research.;67(1): 65-70.
13. Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H, Slickers P, Ehricht R. (2007). Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. Veterinary microbiology.;125(1):128-40.
14. Oliveira AA, Pinheiro JW, Mota RA, Cunha ML, Lopes CA, Rocha NS. (2011). Phenotype characterization of Staphylococcus species strains isolated from buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.23(6):1208-11.
15. Özpinar N, Gumussoy KS. (2013). Phenotypic and Genotypic Determination of Antibiotic Resistant and Biofilm Forming *Staphylococcus aureus* Isolated in Erzincan Tulum Cheese. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 19(3:(517-521.
16. Quinn PJ, Carter M, Markey B, Carter GR. (1994).Clinical veterinary microbiology. Wolfe publishing London.
17. Saei HD, Ahmadi M, Mardani K, Batavani RA. (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(1–2):202-6.
18. Saleem MY, Awan FN, Zaman T, Chaudhry SR, and Zoyfro V. (2011). Prevalence and Antibacterial Susceptibility in Mastitis in Buffalo and cow around the district Lahore-Pakestan. Pak J Pharm. . 24((1 & 2)):29-33,.
19.Vagdi H, R, Farhoudi Mogadam M, Mirzaii H, Khakpour M. (2011). An evaluation of prevalence and cases of subclinical mastitis and its association with somatic cell count in buffaloes. VetRes Bull. 6(2):161-7.