نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۴ بهار ۱۳۹۶

DOI: 10.22034/vj.2017.107791

بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های همولیزین *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های جداشده از ورم پستان تحت بالینی در منطقه‌ی ساوجبلاغ، استان البرز

• **آرش قاسم عزیزی (نویسنده مسئول)**
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، دانشکده علوم پایه،
گروه زیست شناسی، بروجرد، ایران
• **مسعود حق خواه**
گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
• **هادی پورتقی**
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی،
گروه میکروب شناسی، کرج، ایران
• **علی شیرازی نژاد**
بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شیراز
• **فاطمه ناصرپور**
گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی دانشگاه برورجرد، بروجرد، ایران
تاریخ دریافت:۲۹-۰۹-۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۲۹-۰۱-۱۳۹۵
Email: Dr.azizi86@gmail.com

چکیده

استافیلوکوکوس آرئوس پاتوژن شناخته شـــده در حیوانات و انسان است که عفونت‌های مختلفی از جمله ورم پستان را در گاو، گوســـفند و بز ایجاد می‌کند و همچنین باعث ایجاد درماتیت، مسمومیت و حتی در برخی موارد عفونت شدیدی مانند توکسیک شـــوک سندروم (TSS) در انسان می‌شود. این باکتری منجر به خسارت‌های شـــدید اقتصادی در صنایع لبنیات و همچنین باعث مرگ و میر می‌شـــود. چون این باکتری می‌تواند مقاوم به آنتی بیوتیک‌های مختلف شـــود در نتیجه درمان را مشـــکل می‌کند. مطالعات نشان داده که بین ورم پستان و فاکتورهای حدت این باکتری ارتباط وجود دارد. یکی از این فاکتورهای حدت آنزیم‌های همولیزین می‌باشد. این بررسی به منظور مطالعه فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های همولیزین در *استافیلوکوکوس آرئوس* جدا شده از ورم پســـتان تحت بالینی در منطقه‌ی ساوجبلاغ (استان البرز) در سطح ۵۴۰ رأس گاو شیرده انجام شد. ابتدا کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی که با تست CMT تشـــخیص داده شده بود در آزمایشگاه کشت داده شد. نمونه‌های استافیلوکوکوس آرئوس با تایید تســـت کوآگولاز برای تست PCR آماده شد و در نهایت نتایج PCR و محیط کشت‌ها مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. از ۴۲۰ کارتیه مبتلا به ورم پســـتان تحت بالینی ۸۴ (۲۰٪) نمونه در کشت مثبت شدند. از این ۸۴ (۲۰٪) نمونه ۵۰ (۵۹/۵۳٪) نمونه توسط تست کوآگولاز به عنوان استافیلوکوک کوآگولاز مثبت مشخص شدند. ۴۵ (۹۰٪) نمونه از ۵۰ نمونه در تست PCR مثبت به عنوان *استاف آرئوس* معرفی شدند. بر روی این ۴۵ نمونه کشت در بلاد آگار و PCR انجام شد. نتایج حاصله نشان داد که در برخی نمونه‌ها، ژن های حدت همولیزین براساس کشت باکتری به خوبی بیان می‌شوند که تقریبا با نتایج حاصل از PCR هم پوشانی دارد، پس می‌توان گفت که در بیشتر مواقع فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های حدت باهم رابطه‌ی معناداری را دارند (Pvalue= ۰/۰۰۱)، اما ارتباط مستقیم وجود ندارد زیرا در برخی مواقع ژن‌ها در محیط کشت به خوبی بیان نشده‌اند، بخصوص در ژن همولیزین آلفا این مطلب کاملا محرز می‌باشد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس آرئوس، ورم پستان، ژن‌های همولیزین، فنوتیپ، ژنوتیپ، PCR.

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 14-20

Phenotypic and Genotypic Analysis of Haemolysin Genes of ***Staphylococcus aureus*** Isolated from Subclinical Mastitis in Savojbolagh County, Alborz Province

By: Ghasem Azizi, A., (Corresponding Author) Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran. Haghkhah, M., Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz, Iran. Pourtaghi, H., Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. Shirazinezhad, A., Depatment of Virology, Razi vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran. and Naserpour, F., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Borujerd Branch, Borujerd, Iran.

Received: 2015-12-20 Accepted: 2016-04-17

Email: dr.azizi86@gmail.com

Staphylococcus aureus pathogens are known in animals and humans. They cause various infections such as mastitis in cattle, sheep and goats, as well as dermatitis, poisoning and even in some cases severe infections such as toxic shock syndrome (TSS) in humans. The bacteria also lead to severe economic losses and mortality in dairy industry, due to the fact that the bacteria can become resistant to antibiotics as a result of treatment makes it difficult. Studies have shown that there is a relationship between mastitis and bacterial virulence factors, one of which is haemolysin enzyme. The aim of this study was to analyze the phenotypes and genotypes of haemolysin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from 540 subclinical bovine mastitis in Savojbolagh county, Alborz province. Subclinical mastitis-affected quarters which has been detected by CMT, were cultured in the laboratory. *Staphylococcus aureus* samples positive for coagulase test were analyzed by PCR and the results of PCR and culture were compared. Of 420 subclinical bovine mastitis samples, 84(20%) were determined positive by culture. Fifty (59.53%) samples were found positive by coagulase test. Forty five samples (90%) out of this 50 were positive by PCR test. These 45 samples were culture on blood agar and analyzed by PCR . The results showed that in some cases, based on bacterial cultures, haemolysin virulence genes were well expressed and the results almost collapsed with the results of PCR. Hence, we can say that in most cases, there is a significant relationship (P value = 0/001) between the phenotypes and genotypes of virulence genes. However, there is no direct relation, because in some cases, genes are not expressed in culture as well and this is quite obvious in alpha haemolysin gene.

Key words: *Staphylococcus aureus,* mastitis, haemolysin genes, phenotype, genotype, PCR

مقدمه

ورم پستان التهاب غدد پستانی است که یکی از علل آن عفونت‌های میکروبی می‌باشد. ورم پستان بعد از بیماری‌های تولید مثلی مهم‌ترین عامل ضرر و زیان در گاوداری‌های صنعتی است. این ضرر و زیان عمدتا بعلت کاهش تولید شیر، کیفیت پایین شیر و هزینه‌های زیاد تولید است (۱ و ۲). از بین تمام عوامل ورم پستان *استافیلوکوکوس آرئوس* مهم‌ترین عامل واگیر شناخته شده است (۳). این باکتری سلامتی گاو شیری را به شدت تهدید می‌کند (۴). انتقال این باکتری بین گاوها معمولا در حین شیردهی از طریق دست شیردوشان و یا خرچنگ‌های دستگاه شیردوشی بدون ضد عفونی رخ می‌دهد. این باکتری دارای فاکتورهای حدت متعددی نظیر توکسین‌های همولیزین، کوآگولاز، DNase و انتروتوکسین‌های بسیاری است (۴ و ۵). یکی از عوامل مهم حدت در *استافیلوکوکوس آرئوس* همولیزین‌ها می‌باشند که باعث کلونیزه شدن باکتری می‌گردند که انواع آلفا و بتا دارند. آلفا همولیزین بیشتر از نظر سایتوتوکسین‌های استاف آرئوس بررسی می‌شود (۶). سایتوتوکسیسیتی آلفا همولیزین از طریق تشکیل منافذ ترانس ممبرین است. به این صورت که ابتدا آلفا توکسین به شکل مونومر محلول داخل باکتری ترشح شده سپس به شکل هفت پلیمر جمع می‌شود. مولکول‌های کوچک از قبیل ATP از میان منفذ به خارج سلول نشت می‌کنند. همچنین باعث تغییر فشار اسمزی می‌شود. در همین زمان ورود کلسیم یکسری واکنش‌های ثانویه را تحریک می‌کند مثل تولید فاکتورهای اسید آراشیدونیک، ATP، منیزیم و GTP. سپس اندونوکلئازها فعال شده، سایتوکین‌هایی مثل اینترلوکین ۲ آزاد می‌شوند،

ساختمان غشاء تغییر می‌کند و مرگ سلول اپیتلیال رخ می دهد (۷ و ۸) بتا همولیزین با فعالیتی شبیه فسفولیپاز C به صورت اختصاصی باعث ایجاد شکافی در اسفنگو میلین غشاء سلولی می‌شود. این همولیزین hot cold lysis است. این عامل باعث نشت سلولی بوسیله لیز سلولی می‌شود. بتا همولیزین باعث آسیب به سلول‌های اپیتلیال پستانی گاو می‌شود(۹)، چسبندگی استاف آرئوس و همچنین تکثیر باکتری را افزایش می‌دهد و باعث افزایش آسیب به گاو بوسیله آلفا همولیزین می‌شود (۴). مطالعات مختلف ارتباط بین همولیزین‌های استاف آرئوس را با وخامت ورم پستان نشان می‌دهند (۱۰). در برخی از مطالعات نیز نتایجی حاصل گردیده است که نشان می‌دهد ارتباطی بین ژن‌های hla و hlb با فنوتیپ همولیزین آلفا و بتا وجود ندارد (۴) ضمنا استافیلوکوکوس آرئوس به شدت نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک مقاوم می‌شود که ریشه‌کنی آن را مشکل می‌کند (۱۱). به همین دلیل شناسایی این عامل از اهمیت زیادی برخوردار است. اخیرا برای شناسایی ژن‌های همولیزین از موارد ورم پستان از تکنیک مولکولی PCR استفاده می‌شود (۱۲). در این مطالعه سعی به بررسی ژن‌های حدت hla و hlb استافیلوکوکوس آرئوس‌های جدا شده از ورم پستان در منطقه‌ی ساوجبلاغ، استان البرز از طریق روش مولکولیPCR و بررسی فنوتیپ این ژن‌ها در محیط کشت بلادآگار می‌باشد.

مواد و روش کار

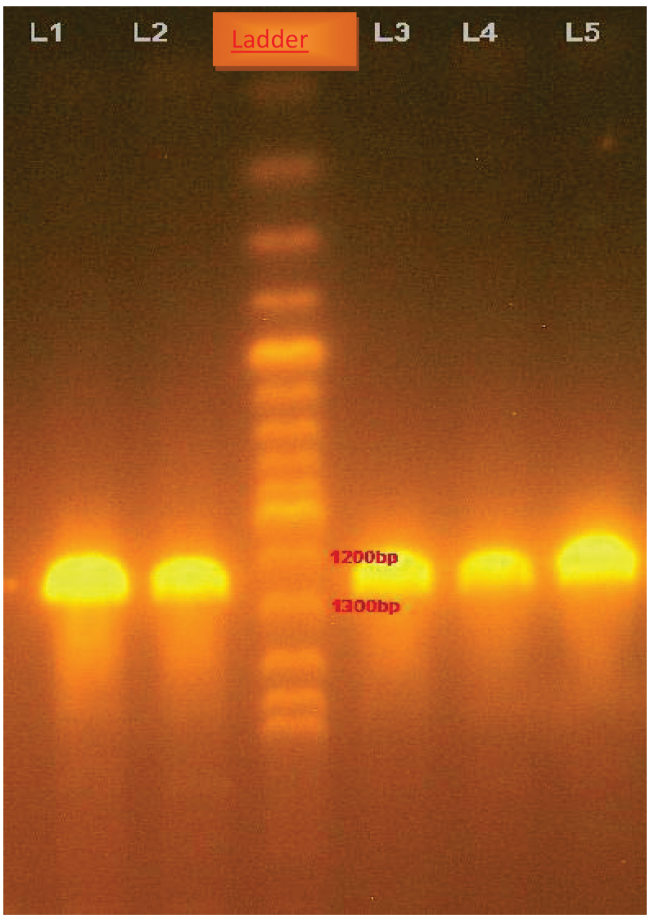
شناسایی ورم پستان تحت بالینی و نمونه‌گیری

برای شناسایی کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی از California Mastitis Test (CMT) برای ۵۴۰ رأس گاوشیرده از ۸ گاوداری در منطقه‌ی ساوجبلاغ استان البرز استفاده شد. در مورد نمونه‌های کارتیه مثبت از نظر CMT اقدام به نمونه‌گیری شد. به این طریق که با استریل کردن نوک تیت با الکل ۷۰ درصد و دور ریختن ۳ دوشش اول هر کارتیه مقدار ۳۰ میلی‌لیتر شیر در ظروف استریل ریخته شد و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. به دلیل اینکه CMT یک آزمون غربالگری کیفی در سطح گاوداری است در آزمایشگاه برای تایید وجود ورم پستان تحت بالینی اقدام به شمارش سلول‌های سوماتیک به روش مستقیم شد. در مورد نمونه‌هایی که مقدار سلول‌های سوماتیک آن‌ها از مقدار استانداردی که انجمن بین‌المللی ورم پستان معرفی کرده است (cell/ml۲۰۰۰۰۰)، بالاتر بود، به عنوان ورم پستان تحت بالینی منظور گردید.

کشت و جداسازی عامل بیماری زا: برای شناسایی عامل پاتوژن ایجادکننده ورم پستان تحت بالینی در آزمایشگاه نمونه‌های شیر بر روی ۳ محیط کشت به صورت خطی کشت داده شد (آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند و محیط کشت اختصاصی و افتراقی برد پارکر و مکانکی). در محیط کشت بلادآگار کلنی‌های که به رنگ زرد مایل به سفید بودند و همچنین همان کلنی‌ها در محیط کشت برد پارکر به رنگ سیاه باهاله‌ی شفاف (شبیه چشم ماهی) بودند شناسایی شدند. که کلنی‌ها پس از تهیه لام و رنگ آمیزی گرم به صورت گرم مثبت با آرایش کوکوسی در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. آن‌هایی که از لحاظ آنزیم کاتالاز مثبت بودند به عنوان جنس استافیلوکوکوس در نظر گرفته شدند. جهت بررسی گونه‌ی استافیلوکوکوس از تست کوآگولاز در لوله استفاده شد. آن نمونه‌هایی که کوآگولاز مثبت بودند، به عنوان *استافیلوکوکوس آرئوس* در نظر گرفته شدند.

انجام PCR برای تایید قطعی باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس*

برای تایید قطعی استافیلوکوکوس آرئوس از روش مولکول PCR برای تکثیر ژن اختصاصی جنس ۲۳S rRNA با استفاده از پرایمرهای مناسب انجام شد (جدول ۱). برای این منظور روش مقاله آقای ممتاز و همکارانش در سال ۲۰۱۰ و استراب و همکارانش در سال ۱۹۹۹ با تغییرات اندکی انجام شد. برای استخراج ژنوم، باکتری در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد و پس از رسیدن به کدورت مناسب ۱۰۰ µL از کدورت ایجاد شده با ۴۰۰µL آب مقطر استریل مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. جهت انجام PCR، واکنش در حجم ۲۵ µL حاوی ۲ µL مخلوط جفت پرایمرها (۱۰ pmol/µl)، ۰/۶ µL، dNTPs (mMol/Liter۱۰)، µL µL، ۱ ۲۱۰X PCR Buffer، Mgcl۲ (mMol/Liter۲۵)، ۱ µL (U/µL، ۵۰Taq DNA Polymerase و µL ۱۹/۳ آب مقطر استریل، انجام شد. سپس نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی مناسب انتقال داده شد (جدول ۱). پس از تصدیق از لحاظTube coagulase test و تکثیر ژن ۲۳S rRNA با سایز باند ۱۲۵۰ bp (شکل ۱) اقدام به مرحله بعدی و بررسی همولیز جدایه‌ها در محیط کشت گردید.



شکل ۱- نمونه‌های مورد آزمایش L1 تا L5 دارای باند برای ژن 23s rRNA

بررسی همولیزین در جدایه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* در محیط کشت و PCR

بعداز تایید نهایی *استافیلوکوکوس آرئوس*، کلنی‌های دارای ویژگی‌های ذکر شده دوباره بر روی محیط کشت آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند به صورت خطی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت گرمخانه گذاری شد و سپس پلیت‌های کشت داده شده به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت منتقل شد (برای بتا-توکسین که به صورتhot-cold فعال می‌شود). سپس کلنی‌های ایجاد شده از لحاظ همولیزین‌های آلفا، بتا و گاما (عدم وجود همولیز) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت تمام جدایه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* توسط روش مولکولی PCR از لحاظ وجود و عدم وجود ژن‌های حدت همولیزین با پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت (جدول۱). برای این منظور روش مقاله فی و همکارانش در سال۲۰۱۱ با اندکی تغییرات انجام شد. برای استخراج ژنوم از روش جوشاندن استفاده شد. جهت انجام PCR واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱ µL یا ۲target DNA و ۲ µL مخلوط جفت پرایمرها (۲۰ µmol/mL)، ۲ µL/ mMol) dNTPs ۱۰Liter)، ۳ µL ۱۰X PCR Buffer (۱۰۰mM Tris, ۵۰۰Mm kcl ,PH ۸,۴:HCL, ۱۰۰-۱Triton X, ۱۵mM Mgcl۲)، ۵/۰ µL ۰Taq (µmol/ml ۵) DNA Polymerase و ۱۵,۵µL آب مقطر استریل، انجام شد. سپس مراحل حرارتیPCR توسط دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی مناسب انتقال داده شد (جدول ۱). نمونه‌ها پس از الکتروفروز ژل ۱-۱,۵ آگارز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید زیر اشعه UV مشاهده شدند و باندهای ژن hla با سایز ۷۰۴ و ژن hlb با سایز ۴۹۶ دیده شدند (شکل‌های ۲ و ۳).

نتایج

در این مطالعه از ۲۱۶۰ کارتیه‌ای که مورد CMT قرار گرفت تعداد ۴۲۰ (۱۹,۴۵٪) کارتیه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بود که از این تعداد ۸۴ (۲۰٪) نمونه شیر بر اساس کشت و شکل کلنی‌ها در سطح محیط‌های کشت، استافیلوکوکوس معرفی شد. از این ۸۴ نمونه تعداد ۵۰ (۵۹,۵۲٪) نمونه توسط تست کوآگولاز در لوله به عنوان استافیلوکوکوس کوآگولاز مثبت در نظر گرفته شدند که ۴۵ (۹۶٪) نمونه براساس روش مولکولی PCR دارای سکانس ژنی ۲۳S rRNA با سایز ۱۲۵۰ جفت باز بودند (شکل ۱). در نتیجه تعداد ۴۵ نمونه به عنوان *استافیلوکوکوس آرئوس* تشخیص داده شد. از این ۴۵ نمونه *استافیلوکوکوس آرئوس* در محیط کشت آگار۵٪ خون گوسفند (۳۵,۵٪) ۱۶ نمونه دارای آلفا همولیزین،(۲۰٪) ۹ نمونه دارای بتا همولیزین، (۱۷,۷۸٪)۸ نمونه دارای همولیزین دوگانه و (۲۶,۶۷٪) ۱۲ نمونه فاقد همولیزین مشخص (همولیزین گاما) بودند (جدول ۲). پس از بررسی ژن‌های حدت همولیزین توسط روش مولکولی PCR مشخص گردید که (۳۷,۷۸٪)۱۷ نمونه دارای ژن hlb و (۲۰٪) ۹ نمونه دارای ژن hla و (۲۰٪) ۹ نمونه دارای هردو ژن hla و hlb و (۲۲,۲۲٪) ۱۰ نمونه نیز فاقد ژن‌هایhla و hlb بودند (جدول ۳). نتایج حاصله پس از بررسی آنالیزهای آماری توسط SPSS نشان داد در برخی نمونه‌ها ژن‌های حدت همولیزین براساس کشت باکتری به خوبی بیان می‌شوندکه تقریبا با نتایج حاصل از PCR هم پوشانی دارد. پس می‌توان گفت که در بیشتر مواقع فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های حدت باهم رابطه‌ی معناداری دارند (P value=0/001) اما ارتباط مستقیمی وجود ندارد زیرا در برخی مواقع ژن‌ها در محیط کشت به خوبی بیان نمی‌شوند، بخصوص در ژن آلفا همولیزین (hla) این مطلب کاملا محرز می‌باشد.

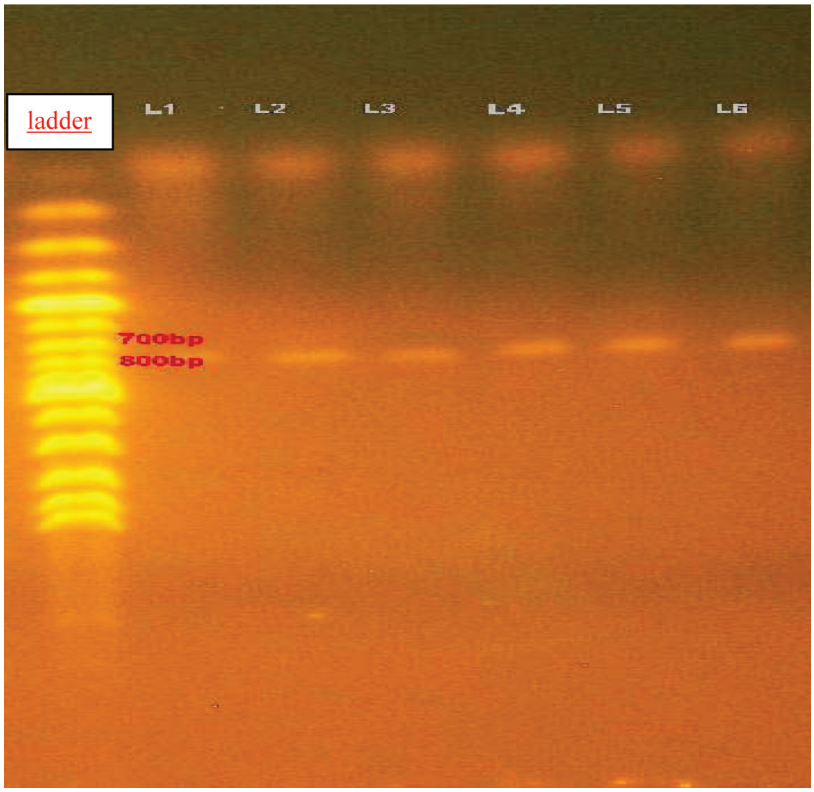
بحث

استاف آرئوس پاتوژن شناخته شده در حیوانات و انسان است که عفونت‌های مختلف از جمله ورم پستان را در گاو، گوسفند و بز ایجاد می‌کند که منجر به خسارت‌های شدید اقتصادی در صنایع لبنیات می‌شود (۱۰) و در نتیجه

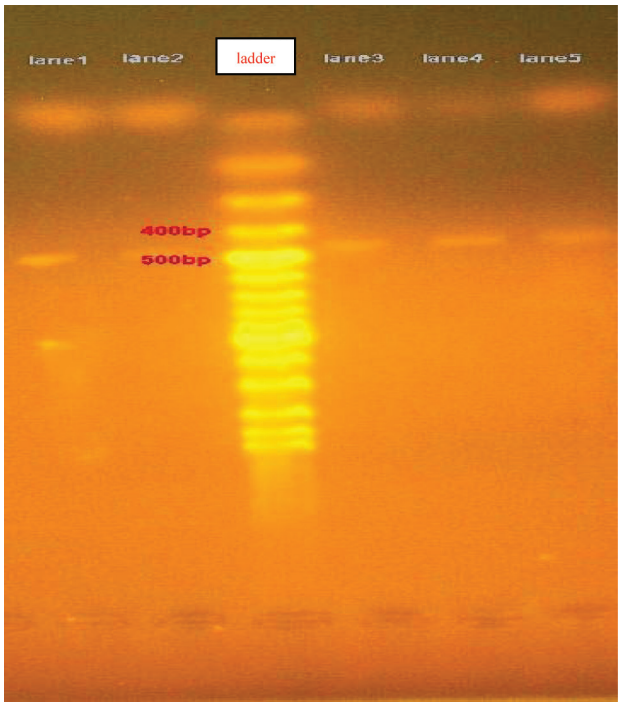
جدول ۱- پرایمرها و شرایط PCR که در این مطالعه استفاده شده است.

Gene	Primer sequence (5-3)	PCR program	Reference	Size of amplified products (bp)
۲۳SrRNA	Forward: ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC	۱	Straub et al, 1999	۱۲۵۰
	Reverse: AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC		Momtaz et al, 2010	
hla	Forward: GAA GTC TGG TGA AAA CCC TGA	۲	Fei w et al, 2011	۷۰۴
	Reverse: TGA ATC CTG TCG CTA ATG CC			
hlb	Forward: CAA TAG TGC CAA AGC CGA AT	۲	Fei w et al, 2011	۴۹۶
	Reverse: TCC AGC ACC ACA ACG AGA AT			

1, 37 cycles (94 °C, 40 s; 64 °C , 1 min; 72 °C , 75 s); 2, 30 cycles (94 °C , 1 min; 60 °C , 45 s; 72 °C , 1 min).



شکل ۲- نمونه‌های مورد آزمایش L1 تا L6 دارای باند با طول 496 bp برای ژن hlb



شکل ۳- نمونه های مورد آزمایش L1 تا L5 دارای باند با طول 704bp برای ژن hlb

کاهش تولید شیر، کیفیت پایین شیر و هزینه‌های زیاد تولید را موجب می‌شود (۶). همچنین می‌تواند عفونت مزمن و شدید را در غدد پستانی ایجاد کند که باعث مرگ و میر می‌شود. از آنجا که *استاف اورئوس* می‌تواند به آنتی بیوتیک‌های مختلف مقاوم شود، ریشه کن کردن آن مشکل خواهد بود (۱۳). همچنین جهت پیشگیری و کنترل ورم پستان، نیاز به شناسایی فاکتورهای آنتی‌ژنیک برای طراحی واکسن موثر است (۶). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده که این باکتری دارای فاکتورهای حدت متنوعی است و بین شدت ورم پستان و فاکتورهای حدت این باکتری ارتباطی وجود دارد. یکی از این فاکتورهای حدت آنزیم‌های همولیزین می‌باشند (۱۰). در این بررسی از ۴۵ نمونه شیر که در تست PCR مثبت بودند یعنی به صورت قطعی نشان دهنده *استاف اورئوس* می باشند، ۳۵,۵ درصد آلفا همولیزین در محیط کشت بلاد آگار و همان کلنی‌ها در بررسی مولکولی (PCR) ۳۷,۷۸ درصد توکسین آلفا (همولیز آلفا) داشتند که در PCR نتایج کمی بالاتر از نتیجه کشت بود. این مسئله به این دلیل است که همولیز توکسین آلفا به خوبی در محیط کشت خون گوسفند ظاهر نمی‌شود ولی فنوتیپ بتا همولیزین در محیط کشت به خوبی ظاهر می‌شود. نمونه‌هایی که در محیط کشت فاقد همولیز بودند (٪۲۶,۷) بیشتر از نمونه‌هایی بودند که در PCR تشخیص داده شد بود. این مسئله احتمالا به این دلیل است که ژن‌های hla و hlb ممکن است خاموش شوند، لذا وقتی ژن‌ها بیان نشوند هیچ همولیزی در محیط کشت ظاهر نمی‌شود (۴). همچنین این احتمال وجود دارد که پلیت به مدت زمان مناسب انکوبه نشده باشد تا همولیز آن بطور مناسبی ظاهر شود. علاوه بر این ممکن است اگر خون دیگری مانند خون خرگوش بجای خون گوسفند استفاده می‌شد، نتیجه متفاوتی حاصل می‌شد (۱۰). برای دابل همولیز نیز بهتر است به جای PCR ساده از Multiplex PCR استفاده شود.

در این بررسی توکسین آلفا بیشتر از بقیه انواع همولیزین‌ها بیان شده است که با مطالعه کنی در سال ۱۹۹۳ و فی در سال ۲۰۱۱ مطابقت دارد. ولی در بررسی‌های جولیو در سال ۲۰۰۸ و داسیلوا در سال ۲۰۰۵ بتا همولیزین، توکسین عمده در موارد ایزوله شده ورم پستان نشان داده شد و اشاره شده است که در موارد ورم پستان حاد یا تحت حاد *استافیلوکوکوس آرئوس* ایزوله شده، مقدار بیشتری بتا توکسین نسبت به موارد مزمن تولید می‌کند و سویه‌هایی که آلفا همولیزین را سنتز می‌کنند هم با بتا همولیزین مرتبط هستند. در نهایت این مطالعه نشان داد که فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های همولیزین با هم رابطه معنی‌داری دارند (p<۰/۰۵) که این عکس نتایج آریانت و فی بود. این مسئله ممکن است به این دلیل باشد که تعداد نمونه در این بررسی کم بود. از سویی دیگر این مطالعه در ورم پستان تحت بالینی انجام شده است که احتمالا در بیان بیشتر ژن hlb نقش بسزایی دارد. بطور کلی ژن همولیزین جزء ژن‌های پلی مورف است (۴) که برای تایپینگ *استافیلوکوکوس آرئوس*های ایزوله شده در موارد ورم پستان استفاده می‌شود.

منابع مورد استفاده

1- Ebrahimi, A. Akhavan Taheri, M., (2009),Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord, Iran, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, Vol. 10, No. 3, Ser. No. 28.

2- Bolourchi M, Mokhber Dezfouli M. R., Kasravi R., Moghimi Esfandabadi A., Hovareshti, P. (2008),An estimation of national average of milk somatic cell count and production losses due to subclinical mastitis in commercial dairy herds in Iran. *J Vet. Res.,* 63: 263-266.

3- Watanabe S, Ito T, Sasaki T, Li S, Uchiyama I, Kishii K, Kikuchi K, Leo Skov R, Hiramatsu K (2009), Genetic diversity of Staphylocoagulase genes (coa): insight into the evolution of variable chromosomal virulence Factors in *Staphylococcus aureus*, journal.pone DOI: 10.1371.

جدول۲- همولیزین ۵۴ نمونه *استافیلوکوکوس آرئوس* بر روی آگار حاوی ۵٪خون گوسفند

نوع همولیز	آلفا	بتا	دوگانه	گاما
تعداد (درصد) نمونه‌ها	۱۶ (٪۳۵,۵۵)	۹ (٪۲۰)	۸ (٪۱۷,۷۸)	۱۲ (٪۲۶,۶۷)

جدول ۳- ژن های همولیزین در ۵۴ نمونه *استافیلوکوکوس آرئوس* که توسط روش مولکولی PCR سنجش شده است.

نوع ژن های همولیزین	hla	hlb	hla+hlb	none
تعداد (درصد) نمونه‌ها	۹ (٪۲۰)	۱۷ (٪۳۷,۷۸)	۹ (٪۲۰)	۱۰ (٪۲۲,۲۲)

4- Fei w, hongjun y, bin h, changfa w, yundong g, qifeng zh (2011), Study on the haemolysin phenotype and the genotype distribution of *Staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in Shandong dairy farms, *Intern J Appl Res Vet Med*, vol. 9, NO:4.

5- Bhakdi, S., Tranum, J. (1991), Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus. J, microbial. Rev*, 55(4) 733-751.

6- Julio C. Franco G, Libertad González V, Sandra C. Gómez M, Juan M. Carrillo G. and José J. Ramírez C(2008), Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in México, *J, eGnosis*,Vol. 6, Art. 7.

7- Saumyas S, Srivasta va, Satyabrata P, Amita S, Neesar A, Aejazur R, Krishnasastry V. membrane (2009), bound monomer of staphylococcal a-haemolysin induces caspase activation and apoptotic cell death despite initiation of membrane repair pathway, *J. plos one* 4(7): e6293

8- Füssle R, Bhakdi S, Sziegoleit A, Tranum-Jensen J, Kranz T, Wellensiek HJ (1981). On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha toxin, *J. cell Biol*, 91(1), 83-9

9- Cifrian E, Guidry A,J, Bramley A, J (1996), Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxcity ,proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cell. *J. vet microbial,* 48(3/4),187-198.

10- Ariyanti, D, Salasia, S, Tato S, (2011) Characterization of Haemolysin of *Staphylococcus aureus* isolated from Food of animal origin, *Journal of Biotechnology*, Vol. 16, No:1 PP:32.37.

11- Delgado S, GarcIa P, Fernandez L, Jimenez E, RodrIguez-Banos M, del Campo R & Juan M, (2011), Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in Human and bovine mastitis, *J, FEMS Immunol Med Microbiol* 62 ,225–235.

12- Rusenova N,Gebreyes W, Koleva M, Mitev J, Penev T, Vasilev N, Mitev A T(2013), Comparison of three methods for routine detection of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis, *J, Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (4): 709-712.

13- Momtaz H, Rahimi E , Tajbakhsh E (2010), Detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in Iran, *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(25), pp. 3753-3758.

14- Da Silva, R. E., Boechat, J. U. D., Martins, J. C. D., Ferreira, W. P. B., Sequera, A. P. S., and Da silva, N (2005), Haemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herd. *J. Science. Small rum. res.*, 56, 271-275.

15- Straub, Joachim A.; Hertel, Christian; Hammes, Walter P, A (1999), 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction–based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products, *Journal of Food Protection*. pp. 1103-1227, pp. 1150-1156 (7).

16- Kenny K, Reiser R F, Bastida-Corcuera F D and Norcross N L (1993), Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*, March *J. Clin. Microbiol.* vol. 31 no. 3 706-707.