DOI:10.22092/vj.2017.113188
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارتباط ژن‌های حدت *استافیلوکوکوس اورئوس* با شمارش سلول‌های بدنی در ورم پستان‌های بالینی و تحت بالینی در استان البرز در فروردین تا شهریور ۱۳۹۳

● هادی پورتقی
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج- ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۰۷-۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۱۰-۰۱
Email: hadi.pourtaghi1@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی حضور برخی ژن‌های مهم در ارتباط با حدت در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی و بررسی ارتباط این ژن‌ها با میزان Somatic Cell Count (SCC) یا شمارش سلول‌های بدنی به عنوان یک شاخص التهابی در بافت پستان بود. برای این منظور حضور شش ژن مهم حدت *hla*،*agrIII*،*SpaA*،*coa*،*clfA* و *hlb* به ترتیب مربوط به عامل توده‌ای‌کننده، کواگولاز، ناحیه X کدکننده پروتئین A، ژن تنظیم کننده فرعی، همولیزین A و همولیزین B، با استفاده از روش PCR بررسی شد. میزان فراوانی این ژن‌ها تعیین شد و با میزان SCC مقایسه شد. بعد از آنالیز ارتباط معنی‌دار بین ژن‌های حدت و افزایش SCC مشاهده شد ($p \leq ۰/۰۵$). طبق نتایج، شش پروفایل مربوط به ورم پستان‌های بالینی بود و تمامی این شش پروفایل مربوط به ورم پستان بالینی، به غیر از یک پروفایل، به صورت انحصاری در محدوده SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ قرار داشتند. این موضوع حاکی از این امر است که افزایش حضور ژن‌های حدت باعث افزایش قدرت بیماری‌زایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و موجب تغییر ورم پستان ازحالت تحت بالینی به بالینی می‌گردد. همچنین این موضوع حاکی از این امر است که هر چقدر سهم حضور ژن‌های حدت در باکتری بیشتر باشد، حدت باکتری افزایش یافته و با ایجاد تخریب و التهاب بیشتر در بافت پستان باعث افزایش SCC در شیر می‌گردد.

کلمات کلیدی: شمارش سلول‌های بدنی شیر، *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن‌های حدت، ورم پستان بالینی و تحت بالینی، استان البرز

Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 29-39

Association of virulence genes of *Staphylococcus aureus* and somatic cell count in clinical and subclinical mastitis cases in Alborz province during April to September 2014

By: Pourtaghi, *H., Asisstant Prefossor, Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Karaj Branch of Islamic Azad University, Karaj, Iran.*

Received: 2016-09-22 Accepted: 2016-12-21

Email: hadi.pourtaghi1@gmail.com

The aim of present study was to detect some important virulence genes of *Staphylococcus aureus* that were isolated from clinical and subclinical mastitis cases and their correlation with Somatic Cell Count (SCC) as inflammatory indicator of udder was found. Presence of six important genes "*clfA, coa, SpaA, agrIII, hla* and *hlb*" encoding clamping factor, coagulase, X region of protein A gene spa, accessory gene regulator, hemolysin A and hemolysin B, respectively, were detected using PCR and the results were compared with SCC. After statistical analysis, a significant correlation between virulence genes and increase in somatic cells was observed ($P \leq 0/05$). According to the results, the six virulence gene patterns except one, were presented only in the clinical mastitis isolates and all these isolates were corelated to SCC above 5000000 cell/ml. According to the results, increase in virulence genes that were present in *Staphylococcus aureus* could lead to change the signes of intra mammary infection from subclinical to clinical mastitis. Furthermore, the results indicates that increasing in the number of virulence genes present in *Staphylococcus aureus* improves virulence of bacteria to damage mammary tissues, which leads to increase in SCC.

Key words: Somatic Cell Count, *Staphylococcus aureus*, Virulence genes, Clinical and subclinical mastitis, Alborz province.

مقدمه

آلودگی با استافیلوکوکوس اورئوس هنوز بزرگترین مشکل مرتبط با گاو شیری است. میزان پاسخ به درمان با آنتی‌بیوتیک طی دوره شیرواری بسیار پایین است. بسیاری از گاوهای آلوده به حالت مزمن مبتلا شده و در نهایت از گله حذف و یا کارتیه درگیر کور می‌گردد (۱۹). این باکتری دارای توان ایجاد ورم پستان‌های تحت بالینی و بالینی است. توانایی ایجاد ورم پستان توسط این باکتری تحت تاثیر ژن‌های حدت مختلف هست. حدود ۵۰ پروتئین با عملکردهای زیستی متفاوت در استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده است. عملکرد اصلی اغلب این پروتئین‌ها تبدیل بافت موضع درگیر در بدن میزبان به مواد غذایی مغذی جهت رشد باکتری است. برخی از این پروتئین‌ها دارای کارکرد خاص بوده که توانایی ویژه‌ای را به باکتری در جهت بیماری‌زایی می‌دهند (۱۰). این ژن‌ها باکتری را در ایجاد ورم پستان یاری می‌کنند. ورم پستان هم به صورت بالینی و هم به صورت تحت بالینی یکی از بیماری‌های مهم بافت پستان می‌باشد که اغلب توسط آلودگی به باکتری ایجاد می‌شود. ورم پستان اگر درمان نگردد باعث مشکلات جدی در گله‌های شیری می‌شود که از نظر اقتصادی ملموس بوده و اغلب با کاهش تولید شیر باعث این معضل می‌گردد. باکتری‌های مختلفی می‌توانند باعث ایجاد ورم پستان شوند، استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده ورم پستان می‌باشد. استافیلوکوکوس اورئوس احتمالاً مهمترین باکتری ایجاد کننده التهاب مزمن در بافت پستان است که اغلب به سختی درمان می‌گردد (۲). این باکتری به خوبی به محیط داخلی بافت پستان عادت پیدا کرده و اغلب انتقال آن توسط ماشین شیردوشی، پارچه‌هایی که برای خشک کردن کارتیه به کار می‌روند و یا دست شیردوشان در حین عملیات شیردوشی اتفاق می‌افتد (۱).

میزان حدت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و شکل بیماری که ایجاد می‌کند تحت تاثیر میزان و نوع فاکتورهای حدت می‌باشد که توسط این باکتری بیان می‌شوند. فاکتورهای حدت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به صورت پایدار بیان نمی‌شوند، برخی از آن‌ها برحسب مراحل مختلف آلودگی از برخی دیگر مهم‌ترند (۱۷). بیماری‌زایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس پیچیده بوده و شاید با ساخت پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی و در ادامه با ساخت پروتئین‌های ترشحی مرتبط باشد که موجب آسیب سلول‌های میزبان می‌گردد (۴). فاکتورهای حدت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس نحوه عملکرد به چند دسته تقسیم می‌شوند: فاکتورهایی که باعث اتصال باکتری به دیواره سلول‌های میزبان می‌شوند، فاکتورهایی که باعث آسیب بافت پستان می‌شوند و فاکتورهایی که باکتری را از سیستم دفاعی میزبان و یا آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت می‌کنند (۱۶). اتصال به اجزای مختلف داربست خارج سلولی

همانند فیبرینوژن، فیبرونکتین و کلاژن امکان استقرار باکتری و آسیب بافت را فراهم می‌کند. فاکتور تجمیع‌کننده A (*clfA*) باعث ایجاد لخته شده و یکی از مهم‌ترین عوامل شناخته شده در ایجاد اندوکاردیت در انسان است. پروتئین کواگولاز توانایی تبدیل فیبرینوژن به فیبرین را با مکانیسمی متفاوت از تکوین لخته در بدن دارد. بین ژن *coa* و ورم پستان در گاو رابطه مستقیمی وجود دارد (۱۸). به دنبال استقرار اولیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس طیف وسیعی از پروتئین‌های ترشحی از جمله همولیزین آلفا (*hla*) و همولیزین بتا (*hlb*) تولید می‌شود که به باکتری توانایی استقرار بیشتر داده و آسیب بافت پستان را فراهم می‌کند. پروتئین A جزئی از دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس است که با پیوند کووالانسی به پپتیدوگلیکان متصل می‌شود. این پروتئین توانایی اتصال به قطعه fc ایمونوگلوبولین‌ها را در اغلب گونه‌های پستانداران دارد، بنابراین باعث جلوگیری از دفاع ناشی از ایمنی همورال می‌شود. این پروتئین توسط ژن *Spa* با یک ناحیه پلی‌مورفیک (X) و ناحیه ثابت کد می‌شود (۹). دسته دیگر فاکتورهای حدت مربوط به ژن‌های تنظیم بیان ژن هستند که در تنظیم بیان ژن‌های حدت در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نقش دارند، ژن *agr* یکی از ژن‌های تنظیم بیان مهم است (۱۴، ۲۸). این ژن برای ایجاد عفونت در بسیاری از عفونت‌های تجربی الزامی است. *RNAIII* مهمترین مولکول تنظیمی سیستم *agr* بوده و مسئول افزایش ساخت پروتئین‌های خارج سلولی و کاهش ساخت پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی طی اواخر دوره رشد نمایی باکتری است (۱۳).

شمارش سلول‌های بدنی (SCC) وسیله پیشگویی خوبی برای ارزیابی التهاب بافت پستان می‌باشد که ۷۵ درصد از آن مربوط به گلبول‌های سفید مثل نوتروفیل، ماکروفاژ و لنفوسیت و ۲۵ درصد از آن مربوط به سلول‌های اپی‌تلیال و گلبول‌های قرمز می‌باشد. گلبول‌های سفید باعث افزایش پاسخ بدن نسبت به آلودگی‌های باکتریایی و آسیب بافتی می‌شود (۲۵). افزایش SCC در شیر باعث کاهش کیفیت آن می‌گردد. SCC به صورت جهانی به عنوان شاخص مورد پذیرش جهت ارزیابی التهاب در بافت پستان می‌باشد و آگاهی در مورد میانگین آن در گاو شیروار به عنوان بخشی از برنامه کنترل ورم پستان می‌باشد (۱۵).در شیر نرمال SCC به طور معمول زیر ۱۰۰،۰۰۰ عدد است و زمانی که SCC به بالای ۲۰۰،۰۰۰ می‌رسد، پستان آلوده بوده و یا به تازگی از آلودگی پاک شده است (۲۶). شناسایی فاکتورهای حدت در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس که از موارد ورم پستان جداسازی شده‌اند، منجر به افزایش اطلاعات ما در زمینه تولید واکسن می‌شود (۱۶).

هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های حدت در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی و بررسی ارتباط این ژن‌ها با میزان SCC به عنوان یک شاخص التهابی در بافت پستان بود. برای این منظور میزان حضور شش ژن مهم حدت *clfA*□*coa*□*SpaA*□*agrIII*□*hla* و *hlb* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری در هفت گاوداری در استان البرز واقع در مناطق نظرآباد و ساوجبلاغ طی فروردین تا شهریور ۱۳۹۳ انجام شد. به منظور شناسایی کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی از شیرآزما (CMT) استفاده شد. در مورد موارد ورم پستان بالینی نیز بعد از برخورد با مورد ورم پستان بالینی اقدام به نمونه‌گیری شد. شیر کارتیه مبتلا به ورم پستان بعد از ضدعفونی کردن داخل ظرف استریل جمع‌آوری شده و ظرف مدت حداکثر سه ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. همچنین از نمونه‌های ورم پستان بالینی ارجاعی به بیمارستان شماره یک دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و یا آزمایشگاه خصوصی پلاسما نمونه‌گیری انجام شد. در آزمایشگاه به منظور اندازه‌گیری میزان SCC از روش دستی استفاده شد (۶). برای این منظور ابتدا نمونه اخذ شده به خوبی مخلوط شد، سپس ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام در محدوده مربعی در ابعاد یک سانتی‌متر به طور یکنواخت پخش شد. پس از خشک شدن نمونه، به منظور چربی‌زدایی لام به مدت پنج دقیقه در گزیلول قرار داده شد. سپس گسترش به مدت پنج دقیقه در الکل مطلق تثبیت شد. پس از خشک شدن گسترش، رنگ آمیزی سلول‌های آن با استفاده از متیلن بلو ۱ درصد به مدت یک دقیقه انجام شد. پس از شستشوی رنگ با آب و زدودن اضافی رنگ گسترش در الکل مطلق، گسترش خشک و با عدسی روغنی در زیر میکروسکوپ بررسی شد. تعداد ۱۰ شان اتفاقی شمارش و میانگین سلول‌ها در عدد ۵۰۰ هزار ضرب شد تا تعداد SCC بر حسب میلی‌لیتر/سلول به دست آید. میزان SCC نمونه‌ها در چهار محدوده ۲۰۰،۰۰۰ تا ۵۰۰،۰۰۰ و ۶۰۰،۰۰۰ تا ۱،۵۰۰،۰۰۰ و ۱،۶۰۰،۰۰۰ تا ۵،۰۰۰،۰۰۰ و بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ مشخص شد. در آزمایشگاه به منظور شناسایی عامل ایجادکننده ورم پستان با استفاده از کشت باکتریایی از محیط‌های کشت مک‌کانکی آگار (Mac Agar) و بلادآگار (Blood Agar) و بردپارکر آگار (Baird parker) ساخت شرکت مرک، استفاده شد. کوکسی‌های گرم مثبت که از نظر آنزیم‌های کاتالاز و کواگولاز مثبت بودند به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شدند. برای انجام آزمایش کوآگولاز از کلنی‌ها کشت تازه تهیه شده و حضور آنزیم با روش لوله مشخص گردید. برای جداسازی ژنوم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، کشت در محیط نوترینت براث انجام شد و پس از رسیدن به کدورت مناسب و بعد از ۲۴ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت با ۴۰۰ میکرولیتر آب قطر استریل مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. جهت تایید قطعی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از PCR بر روی ژن اختصاصی این باکتری 23srDNA استفاده شد. همچنین در مورد ژنوم‌های جدا شده از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس اقدام به شناسایی شش ژن حدت مربوط به عامل:

clfA (clumping factor),
coa (coagulas),
SpaA X-region (Protein A),
agrIII (accessory gene regulator),
hla (alpha hemolysin),
hlb (beta hemolsin)

به صورت Single و Multiplex شد (جدول ۱). جهت انجام PCR واکنش در حجم ۳۰ میکرولیتر انجام شد و ترکیب PCR برای تمام ژن‌ها ثابت بود. برای این منظور از دو میکرولیتر زوج پرایمرها (با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۰/۶ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۱۰ میلی‌مول در لیتر)، سه میکرولیتر از بافر PCR (با غلظت X ۱۰)، ۱/۸ میکرولیتر $MgCl_2$

(با غلظت ۲۵، ۱۰ میلی‌مول در لیتر)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (با غلظت پنج واحد در میکرولیتر)، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر عاری از DNase استفاده شد و در نهایت ۲/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده با روش جوشاندن به عنوان الگو به تیوب اضافه شد. آنالیز واکنش PCR مربوط به ژن‌های 23srDNA، *hla□agrIII□SpaA□coa□clfA* و *hlb*، شامل پرایمرهای مربوطه، سیکل‌های تکثیر و رفرنس‌های مربوطه در جدول ۱ نمایش داده شده است. پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد.

محصول‌های تولید شده به این ترتیب با استفاده ازالکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه شده در بافر TBE (۸۰ میلی مول تریس، ۸۹ میلی مول بوریک اسید، ۲/۵ میلی مول EDTA) جداسازی و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و از باندها عکس تهیه شد. از مارکر ۱۰۰۰-۱۰۰ جفت باز سیناژن برای تعیین اندازه قطعات استفاده شد. در شکل شماره ۱ و ۲ و ۳ نتایج PCR مربوط به چند ژن نمایش داده شده است.

ارتباط بین حضور ژن‌های حدت *hla□agrIII□SpaA□coa□clfA* و *hlb* در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس با ورم پستان تحت بالینی و ورم پستان بالینی و الگوی SCC با استفاده از آنالیز آماری با نرم افزار SPSS Ver. 18 و مدل آماری مربع کای در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی شد.

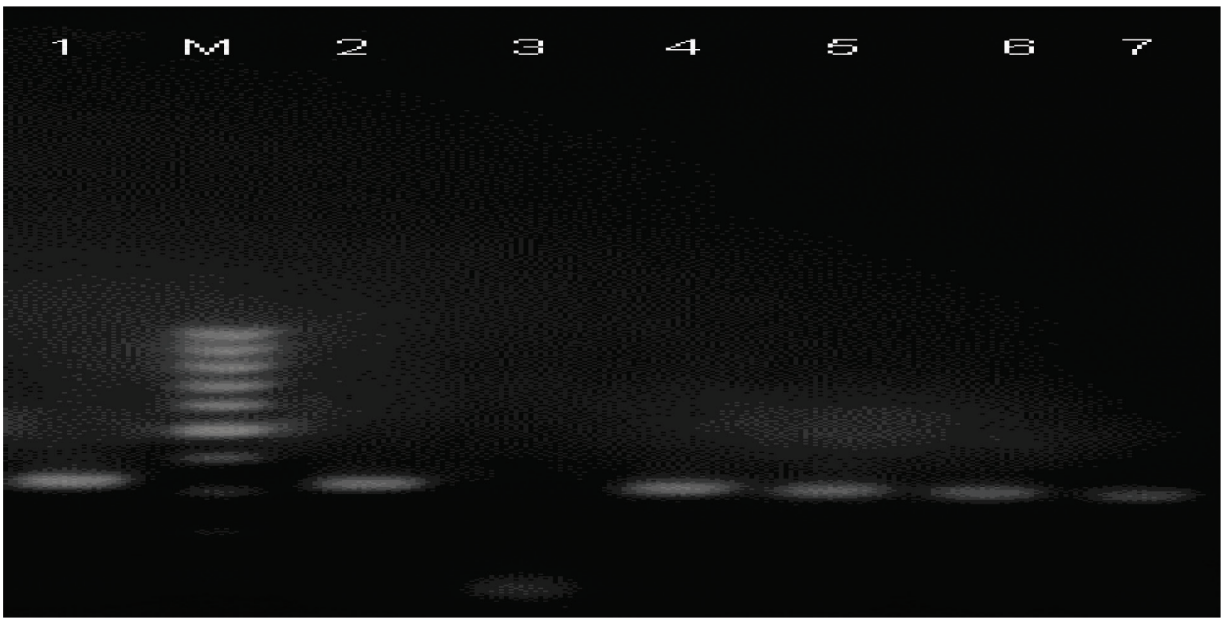
نتایج

در مجموع ۳۳ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از موارد ورم پستان تحت بالینی و ۱۲ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از موارد ورم پستان بالینی و در مجموع ۴۵ جدایه باکتری به دست آمد. طبق نتایج، حضور

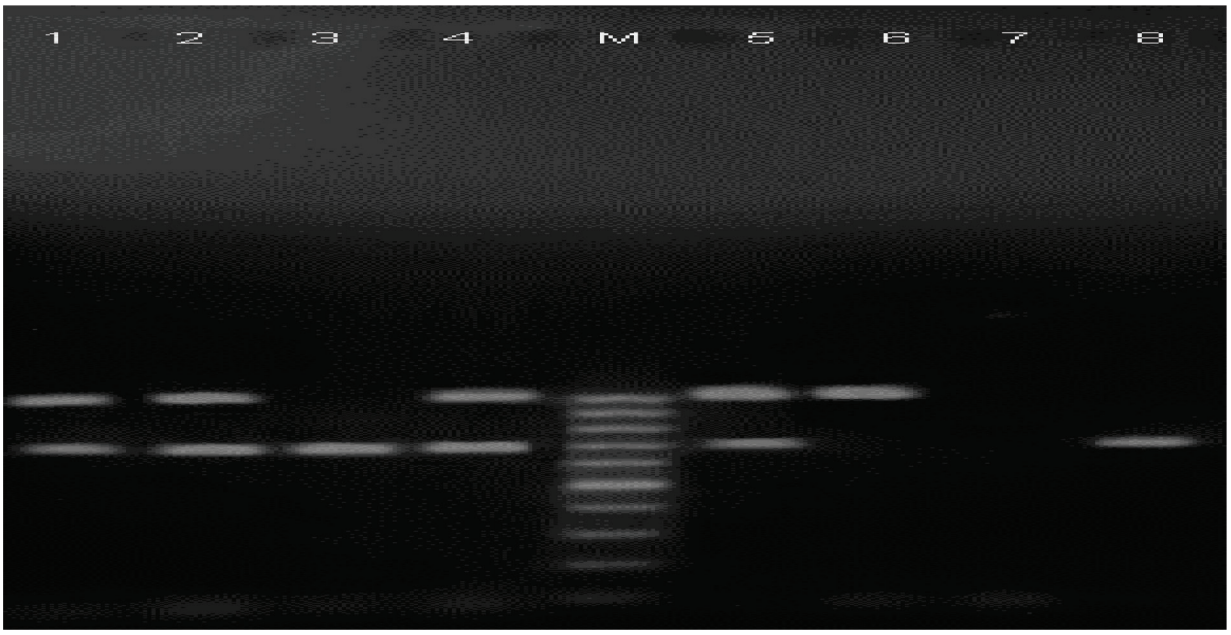
جدول ۱- غلظت NEFA، BHBA، AST،ALT، TNF-α، گلوکز و انسولین (±خطای استاندارد) در گاوهای سالم و گاوهای بیمار (دارای ناهنجاری متابولیک)

ژن	توالی پرایمر (۳ ۵)	برنامه PCRa	اندازه محصول (bp)	منبع
۲۳srDNA	F: ACGGAGTTACAAAGGACGAC R: AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	۱	۱۲۵۰	۲۷
Coa	F: ATAGAGATGCTGGTACAGG R: GCTTCCGATTGTTCGATGC	۲	۷۱۰ ،۹۱۰	۱۷
clfA	F: GGCTTCAGTGCTTGTAGG R: TTTTCAGGGTCAATA TAAGC	۲	۱۰۴۲	۱۷
SpaA-X	F: CAAGCACCAAAAGAGGAA R: CACCAGGTTTAACGACAT	۳	۲۲۰ ،۲۵۳ ،۳۱۵	۱۷
agrIII	Pan: ATGCACATGGTGCACATGC R:GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	۴	۳۲۳	۱۴
Hla	F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	۵	۲۱۰	۳
Hlb	F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	۵	۳۰۰	۳

a: 1 = 35 × (94°C -40s, 64 °C -60s, 72°C -72s); 2 = 35 × (94°C -60s, 58°C -60s, 72°C -60s); 3 = 30 × (94°C -60s, 60°C -60s, 72°C (-60s); 4 = 26 × (94°C -30s, 30°C -30s, 72°C -60s); 5 = 30 × (94°C -60s, 50°C -60s, 72°C -60s)



شکل ۱- ژل آگارز ۱/۵ درصد مربوط به ژن‌های حدت *agr III* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. حفره‌های ۱، ۲، ٤، ٥، ٦ و ٧: نمونه‌های مثبت از نظر ژن *agr III* با باندی به اندازه ۳۲۲ جفت باز و حفره ۳: نمونه منفی. M: مارکر ۱۰۰۰- ۱۰۰ جفت باز.



شکل ۲- ژل آگارز ۱/۵ درصد مربوط به ژن‌های حدت *coa* و *clfA* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. حفره‌های ۳ و ۸: نمونه‌های مثبت از نظر ژن *aoc* با باندی به اندازه ۷۱۰ جفت باز، حفره ٦: نمونه مثبت از نظر ژن *clfA* با باندی به اندازه ۱۰۲۴ جفت باز. حفره‌های ۱، ۲، ٤ و ٥ مربوط به نمونه‌های مثبت از نظر هر دو ژن حدت *coa* و *clfA*، حفره ۷: نمونه منفی. M: مارکر ۱۰۰۰-۱۰۰ جفت باز.

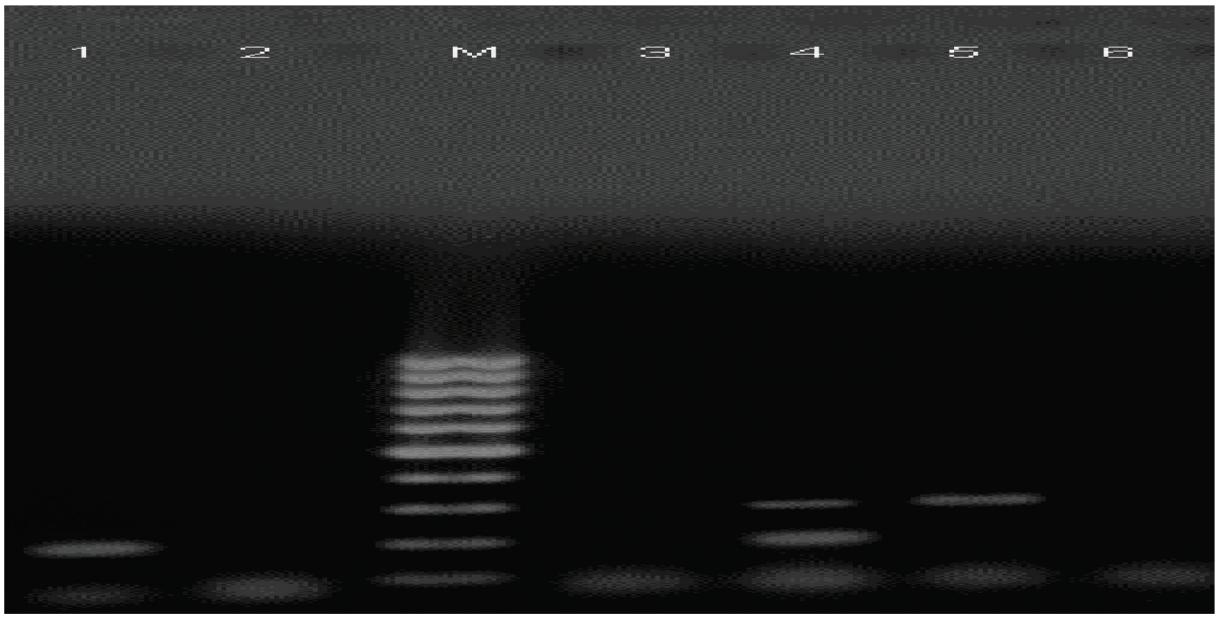
ژن‌های حدت در ۴۵ باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی به ترتیب فراوانی عبارت بود از ژن *agrIII* در ۳۳ نمونه (۷۳/۳ درصد)، ژن *clfA* در ۳۲ نمونه (۷۱/۱ درصد)، ژن *SpaA-X* در ۲۵ نمونه (۵۵/۵ درصد)، ژن *coa* در ۲۳ نمونه (۵۱/۱ درصد)، ژن *hla* در ۱۲ نمونه (۲۶/۶ درصد) و ژن *hlb* در ۸ نمونه (۱۷/۷ درصد). میزان فراوانی هر ژن حدت در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس که در محدوده‌های مختلف SCC به دست آمده بود با یکدیگر مقایسه شد. در جدول ۲ محدوده‌های مختلف SCC و میزان حضور هر ژن حدت در محدوده‌های مختلف SCC نشان داده شده است.

طبق نتایج از ۴۵ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی، ۱۲ جدایه در محدوده SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ هشت جدایه در محدوده SCC ۱،۶۰۰،۰۰۰ تا ۵،۰۰۰،۰۰۰ و ۱۲ جدایه در محدوده SCC ۵۰۰،۰۰۰ تا ۱،۵۰۰،۰۰۰ و ۱۳ جدایه باکتری در محدوده SCC کمتر از ۵۰۰،۰۰۰ شناسایی شد. در مجموع ۱۲ جدایه مربوط به SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰ دارای ۴۸ ژن حدت، هشت جدایه مربوط به SCC ۵۰۰،۰۰۰ تا ۱،۶۰۰،۰۰۰ دارای ۲۳ ژن حدت، ۱۲ جدایه مربوط به SCC ۵۰۰،۰۰۰ تا ۱،۵۰۰،۰۰۰ دارای ۳۸ ژن حدت و ۱۳ جدایه مربوط به SCC کمتر از ۵۰۰،۰۰۰ دارای ۲۴ ژن حدت بودند. ترتیب پراکندگی هر ژن‌حدت در هر محدوده SCC در جدول ۳ به تفکیک نشان داده شده است.

در جدول ۴ پروفایل ژن‌های حدت در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی با وضعیت سلول‌های بدنی نشان داده شده است. بعد از آنالیز آماری ارتباط معنی دار بین ژن‌های حدت و افزایش SCC مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$). طبق نتایج شش پروفایل مربوط به ورم پستان‌های بالینی بود و تمامی این شش پروفایل مربوط به ورم پستان بالینی، به غیر از یک پروفایل به صورت انحصاری در محدوده SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ قرار داشتند. همچنین در ۳۳ جدایه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که از موارد ورم پستان‌های تحت بالینی جدا شده بود، ۱۱ پروفایل متفاوت از ژن‌های حدت دیده شد. شش پروفایل در محدوده SCC ۱،۶۰۰،۰۰۰ تا ۵،۰۰۰،۰۰ و نه پروفایل درمحدوده SCC ۵۰۰،۰۰۰ تا ۱،۵۰۰،۰۰۰ و شش پروفایل در محدوده SCC کمتر از ۵۰۰،۰۰۰ قرار داشت. در مجموع ۲۱ پروفایل مختلف در بین محدوده‌های مختلف سلول‌های بدنی پراکنده شده بودند. طبق این جدول پروفایل ژنی *coa*،*agrIII* و *clfA* در تمامی چهار محدوده SCC دیده شد. البته این پروفایل در محدوده SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ بیشترین حضور (چهار جدایه) داشت در حالی که در بقیه محدوده‌های SCC تنها یک جدایه دارای این پروفایل ژنی بود. در جدول ۴ پروفایل ژن‌های حدت در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی با وضعیت سلول‌های بدنی مقایسه و نشان داده شده است.

بحث

هدف از این مطالعه بررسی حضور ژن‌های حدت در باکتری‌های



شکل ۳- ژل آگارز ۱/۵ درصد مربوط به ژن‌های حدت *hla* و *hlb* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. حفره ۱: نمونه مثبت از نظر ژن *hla* با باندی به اندازه ۲۱۰ جفت باز، حفره۵: نمونه مثبت از نظر ژن *hlb* با باندی به اندازه ۳۰۰ جفت باز. حفره ٤: نمونه مثبت از نظر هر دو ژن حدت *hla* و *hlb*. حفره‌های ۲، ۳ و ۵: نمونه‌های منفی. M: مارکر ۱۰۰۰-۱۰۰ جفت باز.

استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی و بررسی ارتباط این ژن‌ها با میزان SCC به عنوان یک شاخص التهابی در بافت پستان بود. برای این منظور میزان حضور شش ژن مهم حدت *hla*□*agrIII*□*SpaA*□*coa*□*clfA* و *hlb* بررسی شد که طبق نتایج، حضور ژن‌های حدت در ۴۵ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی به ترتیب فراوانی عبارت بود از ژن *agrIII* در ۳۳ نمونه (۷۳/۳ درصد)، ژن *clfA* در ۳۲ نمونه (۷۱/۱ درصد)، ژن *SpaA-X* در ۲۵ نمونه (۵۵/۵ درصد)، ژن *coa* در ۲۳ نمونه (۵۱/۱ درصد)، ژن *hla* در ۱۲ نمونه (۲۶/۶ درصد) و ژن *hlb* در هشت نمونه (۱۷/۷ درصد). طبق نتایج، بیشترین حضور ژن‌های حدت در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان به ترتیب مربوط به ژن‌های *agrIII* و *clfA* و کمترین حضور ژن‌های حدت مربوط به ژن‌های *hla* و *hlb* بود. فاکتورهای حدت باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به صورت پایدار بیان نمی‌شوند، برخی از آنها بر حسب مراحل مختلف آلودگی از برخی دیگر مهمترند (۱۷). *agr* یکی از ژن‌های مهم تنظیم بیان ژن‌های حدت در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است. *agr* از نظر بیماری‌زایی در مدل‌های حیوانی مهم است و در اغلب جدایه‌هایی که از موراد بالینی در بدن انسان جدا می‌شوند، وجود دارد. جدایه‌هایی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که از موارد بالینی در انسان جدا می‌شوند ولی از نظر بیان ژن *agr* ضعیف بوده و یا فاقد آن هستند، از مکانیسم‌هایی که دقیقاً مشخص نشده، باعث بیماری می‌شوند (۲۸). *RNAIII* مهمترین مولکول تنظیمی سیستم *agr* بوده و مسئول افزایش ساخت پروتئین‌های خارج سلولی و کاهش ساخت پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی است (۱۳). احتمالاً باکتری‌های فاقد *agr* که به فراوانی از نمونه‌های بالینی جداسازی می‌شوند، در شروع بیماری نقشی نداشته و در در مراحل

جدول۲- تعداد کل ژن‌های حدت در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی و حضور هر یک از این ژن‌ها در محدوده‌های مختلف شمارش سلول‌های بدنی

SCC	۲۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰-۱۵۰۰۰۰۰	۱۶۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰۰	<۵۰۰۰۰۰۰	جمع
clfA	۵	۹	۶	۱۲	۳۲
coa	۳	۷	۴	۹	۲۳
SpaA-X	۸	۷	۴	۶	۲۵
agrIII	۵	۱۰	۶	۱۲	۳۳
hla	۲	۴	۰	۶	۱۲
hlb	۱	۱	۳	۳	۸

جدول ۳- تعداد ژن‌های حدت در محدوده‌های مختلف شمارش سلول‌های بدنی در نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی

SCC	۲۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰	۶۰۰۰۰۰-۱۵۰۰۰۰۰	۱۶۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰۰	<۵۰۰۰۰۰۰
clfA	۵	۹	۶	۱۲
coa	۳	۷	۴	۹
SpaA-X	۸	۷	۴	۶
agrIII	۵	۱۰	۶	۱۲
hla	۲	۴	۰	۶
hlb	۱	۱	۳	۳
جمع	۲۴	۳۸	۲۳	۴۸

جدول٤- مقایسه پروفایل ژن‌های حدت در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی با وضعیت سلول‌های بدنی

درصد	تعداد جدایه‌ها	ورم پستان	پروفایل ژن‌های حدت	شماره پروفایل	SCC*
۲/۲۲	۱	بالینی	*clfA، coa، SpaA-X، agrIII، hla*	۱	۴
۴/۴۴	۲	بالینی	*clfA، coa، SpaAX، agrIII*	۲	۴
۴/۴۴	۲	بالینی	*clfA، coa، SpaA-X، agrIII، hla، hlb*	۳	۴
۸/۸۸	۴	بالینی	*clfA، coa، agrIII*	۴	۴
۲/۲۲	۱	بالینی	*clfA، SpaA-X، agrIII، hla، hlb*	۵	۴
۴/۴۴	۲	بالینی	*clfA، SpaA-X، agrIII، hla*	۶	۴
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، coa، agrIII، hlb*	۱	۳
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، SpaA-X، agrIII، hla*	۲	۳
۴/۴۴	۲	تحت بالینی	*clfA، SpaA-X، agrIII، hlb*	۳	۳
۴/۴۴	۲	تحت بالینی	*clfA، coa، agrIII*	۴	۳
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*coa، SpaA-X*	۵	۳
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، SpaA-X، agrIII*	۶	۳
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، coa، agrIII، hla*	۱	۲
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، SpaA-X، agrIII، hlb*	۲	۲
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، coa، agrIII، hlb*	۳	۲
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، coa، agrIII*	۴	۲
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، agrIII*	۵	۲
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، agrIII، hla*	۶	۲
۴/۴۴	۲	تحت بالینی	*coa، SpaA-X، agrIII*	۷	۲
۴/۴۴	۲	تحت بالینی	*coa، agrIII*	۸	۲
۴/۴۴	۲	تحت بالینی	*clfA، SpaA-X، agrIII*	۹	۲
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*clfA، coa، agrIII*	۱	۱
۴/۴۴	۲	تحت بالینی	*clfA، agrIII*	۲	۱
۴/۴۴	۲	تحت بالینی	*clfA، agrIII، hla*	۳	۱
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	*SpaA-X، hlb*	۴	۱
۲/۲۲	۲	تحت بالینی	*coa، SpaA-X*	۵	۱
۱۱/۱۱	۵	تحت بالینی	*SpaA-X*	۶	۱
۱۰۰	۴۵	جمع			

* امتیاز ۴ برابر است با سلول سوماتیک بیش از ۵۰۰۰۰۰۰، امتیاز ۳ برابر است با ۵۰۰۰۰۰۰- ۱۶۰۰۰۰۰، امتیاز ۲ برابر است با ۱۵۰۰۰۰۰- ۵۰۰۰۰۰ و امتیاز ۱ برابر است با سلول سوماتیک کمتر از ۵۰۰۰۰۰.

انتهایی زندگی باکتری ایجاد می‌شوند و از نظر بالینی هم در مراحل بعدی عفونت جداسازی می‌شوند (۲۸). در مطالعه حاضر، شایع‌ترین فاکتور حدت مشاهده شده مربوط به *agrIII* بود و جداسازی نمونه‌هایی که از نظر *agrIII* منفی بودند احتمالاً مربوط به مواردی از ورم پستان می‌باشد که بیشتر حالت مزمن پیدا کرده و یا مربوط به موارد عود مجدد بیماری می‌باشد.

همولیزین بتا *hlb* اسفنگومیلیناز می‌باشد که اغلب در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان دیده می‌شود ولی به ندرت در جدایه‌های انسانی وجود دارد. در مطالعه حاضر *hla* و *hlb* کمترین شیوع را در باکتری‌های جدا شده از ورم پستان داشتند. درصد پایین حضور ژن‌های همولیزین در این جدایه‌ها نشانگر کم اهمیت بودن این ژن‌ها نیست بلکه این نشانگر لزوم حضور ژن‌های تنظیم کننده همانند *agr* و دیگر ژن‌های تنظیمی می‌باشد که باعث تنظیم مثبت این ژن‌ها می‌شود (۲۱).حضور ژن مربوط به پروتئین A با ورم پستان تحت بالینی ارتباط دارد، این موضوع حاکی از این حقیقت است که پروتئین A در واقع یکی از عوامل اصلی تحت تاثیر قرار دهنده سیستم ایمنی پستان گاو می‌باشد (۲۹). پروتئین A توسط ژن *spa* واقع در کروموزوم باکتری کد می‌شود. بیان این ژن طی دوره رشد لگاریتمی زیاد می‌باشد ولی تولید آن طی دوره بعد از رشد لگاریتمی کاهش می‌یابد (۱۲). در مطالعه حاضر نیز شایع‌ترین پروفایل (۱۱/۱۱ درصد) مرتبط با ورم پستان تحت بالینی الگوی تک ژنی *SpaA-X* مربوط به پروتئین A بود.

استافیلوکوکوس اورئوس یک پروتئین خارج سلولی به نام کواگولاز تولید می‌کند که توسط ژنی به نام *coa* کد می‌شود. این پروتئین ترشحی با تولید لخته فیبرینی در اطراف باکتری باعث حفظ آن از دسترس سیستم ایمنی میزبان می‌شود (۱۸). فاکتور تجمیع کننده یا کواگولاز متصل، با اتصال به فیبرین امکان اتصال باکتری به سلول‌های میزبان را فراهم کرده و به دنبال آن امکان تهاجم را برای باکتری فراهم می‌کند. این پروتئین توسط ژنی به نام *clfA* بیان می‌شود (۲۳).بین ژن‌های حدت و به‌خصوص *coa* و ورم پستان در گاو رابطه مستقیمی وجود دارد (۱۸). در مطالعه حاضر ژن‌های *coa* و *clfA* در باکتری‌های جدا شده از ورم پستان‌های بالینی و تحت بالینی و میزان‌های متفاوت SCC با پراکندگی یکسان حضور داشتند.

طبق نتایج شش پروفایل مربوط به ورم پستان‌های بالینی بود و تمامی این شش پروفایل مربوط به ورم پستان بالینی در محدوده SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ قرار داشتند. شایع‌ترین پروفایلی (۸/۸۸ درصد) که باعث ایجاد SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ شده بود مربوط به *agrIII*،*coa*و *clfA* بود. جالب این که پروفایل *agrIII* ، *coa* و *clfA* در محدوده ۱،۶۰۰،۰۰۰ تا ۵،۰۰۰،۰۰۰ نیز جز پروفایل‌های شایع بود (۴/۴۴ درصد) ولی در محدوده پروفایل‌های ۵۰۰،۰۰۰ تا ۱،۵۰۰،۰۰۰ و ۲۰۰،۰۰۰ تا ۵۰۰،۰۰۰ با حضور ۲/۲۲ درصد جزو پروفایل‌های غالب نبود. پروفایل‌های مرتبط با SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰۰ که همگی در ورم پستان‌های بالینی دیده شد، دارای حداقل سه تا پنج ژن حدت بودند، در حالی که شایع‌ترین پروفایل در SCC کمتر از ۵۰۰،۰۰۰ الگوی تک ژنی *SpaA-X* بود. این موضوع حاکی از این امر است که افزایش حضور ژن‌های حدت باعث افزایش قدرت بیماری‌زایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و موجب تغییر ورم پستان ازحالت تحت بالینی به بالینی می‌گردد.

سریع‌ترین و راحت‌ترین راه تشخیص ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری استفاده از تعداد SCC و امتیاز CMT است (۲۲). در CMT ماده موجود در آن با کروموزوم سلول‌های بدنی موجود در شیر واکنش داده و ماده ژله‌ای تولید می‌کند. جهت به دستیابی به نتایج مناسب CMT پس از دور ریختن چند دوشش اول بلافاصله قبل از دوشش شیر توسط دستگاه شیردوش باید انجام شود (۱۹). مهمترین شاخص برای ارزیابی تغییرات تولید شیر در گله SCC است (۸). SCC بالا به معنی ریسک بالای آلودگی شیر با عوامل بیماری‌زا و آلودگی احتمالی با آنتی‌بیوتیک‌ها است (۲۶). مهمترین عاملی که باعث افزایش SCC شیر می‌شود، آلوده شدن بافت پستان به عوامل عفونی است. در مقایسه با عوامل بیماری‌زا در پستان، تمامی سایر فاکتورهای دخیل در میزان SCC تاثیر ناچیزی دارند. SCCشاخص کلی جهت ارزیابی سلامت پستان هست. SCC بالا به معنی آسیب بافت پستان بدون در نظر گرفتن عامل مسبب آن است. استفاده موثر از SCC بستگی به آگاهی از فاکتورهایی دارد که میزان آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۷). الگوی SCC تا حدود زیادی تحت تاثیر تفاوت بین گاوها، عوامل بیماری‌زای مسبب ورم پستان و یا سویه باکتری بیماری‌زا است (۶، ۷، ۲۴). طبق نتایج مطالعه حاضر مشخص شد ۱۲ جدایه مربوط به SCC بیش از ۵،۰۰۰،۰۰ دارای ۴۸ ژن حدت، هشت جدایه مربوط به SCC ۵،۰۰۰،۰۰۰ تا ۱،۶۰۰،۰۰۰ دارای ۲۳ ژن حدت و در مجموع ۷۱ ژن حدت مربوط به SCC در این دو محدوده بالا بود، در حالی که ۱۲ جدایه مربوط به SCC ۵۰۰،۰۰۰ تا ۱،۵۰۰،۰۰۰ دارای ۳۸ ژن حدت و ۱۳ جدایه مربوط به SCC کمتر از ۵۰۰،۰۰۰ دارای ۲۴ ژن حدت بودند و در مجموع ۶۲ ژن حدت مربوط به SCC در این دو محدوده پایین بود. در مجموع ۲۰ جدایه در دو محدوده بالای SCC دارای ۷۱ ژن حدت بودند در حالی که ۲۵ جدایه مربوط به دو محدوده پایین SCC دارای ۶۲ ژن حدت بودند. به عبارت دیگر تعداد کمتر جدایه‌ها در محدوده بالای SCC نسبت به تعداد بیشتر نمونه‌ها در محدوده پایین SCC دارای ژن حدت بیشتری بودند. این موضوع حاکی از این امر است که هرچقدر سهم حضور ژن‌های حدت در باکتری بیشتر باشد، حدت باکتری افزایش یافته و با ایجاد تخریب و التهاب بیشتر در بافت پستان باعث افزایش SCC در شیر می‌گردد. یک بار دیگر به نظر می‌رسد که میزان SCC تحت تاثیر عامل مسبب ورم پستان یا سویه عامل ایجاد کننده ورم پستان می‌باشد (۵، ۷، ۲۴).

در مطالعه‌ای که دکتر حسن ممتاز و همکارانش انجام دادند، از۳۶۰کارتیه نمونه‌برداری شد که ۱۴۰ نمونه از گاوداری‌های چهارمحال و بختیاری و ۲۲۰ نمونه از گاوداری‌های اصفهان جمع‌آوری شد. از CMT به عنوان وسیله شناسایی اولیه کارتیه درگیر با ورم پستان تحت بالینی استفاده شد. در مجموع ۸۶ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از روش‌های میکروبیولوژیکی و PCR بر روی ژن 23srDNA از موارد ورم پستان تحت بالینی شناسایی وجداسازی شد که از ۸۶ نمونه تعداد ۴۲ نمونه دارای ژن coa و ۶۳ نمونه دارای ژن clfA و ۶۹ نمونه دارای ژن *Spa* (X-region) و ۲۲ نمونه دارای ژن *Spa* (IgG Binding) و ۱۹ نمونه دارای ژن *agrIII* بودند. در این مطالعه از CMT به عنوان شاخص اصلی در تشخیص ورم پستان تحت بالینی استفاده شده که از ۸۶ نمونه ۲۰

نمونه دارای گرید یک، ۴۵ نمونه دارای گرید دو و ۲۱ نمونه دارای گرید سه بودند. از تعداد ۴۲ نمونه که دارای ژن *coa* بودند تعداد ۷ نمونه در گرید یک، تعداد ۱۲ نمونه در گرید دو و تعداد ۲۳ نمونه در گرید سه CMT قرار داشتند. در مورد ژن *clfA* ۱۰ نمونه در گرید یک، تعداد ۲۱ نمونه در گرید دو و تعداد ۳۲ نمونه در گرید سه قرار داشتند. در این مطالعه در نهایت مشخص گردید که با افزایش گرید CMT تعداد ژن‌های حدت نیز افزایش یافته است (۲۰).

در مطالعه حاضر CMT به عنوان یک روش غربالگری در گاوداری برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد و SCC در آزمایشگاه به عنوان شاخص اصلی در نظر گرفته شد. این امر به این خاطر بود که CMT به شدت در بررسی افراد مختلف نتایج متفاوت را در پی دارد، بنابراین، SCC به عنوان تست آزمایشگاهی که قابلیت تکرار را در آزمایشگاه دارد، به عنوان تست شاخص برای بررسی التهاب در پستان در نظر گرفته شد. در مطالعه حاضر با افزایش سلول‌های بدنی نیز حضور ژن‌های حدت افزایش یافته و رابطه مستقیمی بین آنها وجود دارد.

ورود باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به داخل مجرای پستان می‌تواند منجر به بروز درگیری بافت‌های داخلی‌تر پستان شود ولی وقوع این امر تحت تاثیر شرایط ویژه‌ای از جمله تعداد اولیه باکتری، دسترسی باکتری به سلول‌های شیر ساز هدف، حدت سویه باکتری و کیفیت و کمیت سیستم ایمنی میزبان است (۱۱). در مطالعه حاضر، عوامل مرتبط با حدت عامل بیماری‌زا بیشتر مد نظر بوده است و توجه به فاکتورهای مرتبط به میزبان جزء اهداف این مطالعه نبود. طبیعتاً با بررسی این عوامل در کنار عوامل مربوط به میزبان، بیشتر می‌توان به نقش مستقیم هر کدام از عوامل حدت پی برد.

منابع مورد استفاده

1. Abera, M., Demie, B., K. Aragaw, K., Regassa, F., A and Regassa, A. (2010). Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 2(3):29- 34.

2. Aires, M., Carlos E.S.R., Parente CESR., Olney Vieira, O., Bonna I.C.F., Denise A. Silva, D.A and Lencastre, H.D. (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* 3845-3849.

3. Adhikari, R.P., Cook, G.M., Lamont, I., Lang, S., Heffernan, H and Smith, J.M.B. (2002). Phenotypic and molecular characterization of community occurring, Western Samoan phage pattern methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50:825-831.

4. Almeida, L.M., Almeida, M.Z.P.R.B., Mendonça, C.L and Mamizuka, E.M. (2013). Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(2):493-498.

5. Atalla, H., Gyles, C., Wilkie, B., Leslie, K and Mallard, B. (2009). Somatic cell scores and clinical signs following experimental intramammary infection of dairy cows with a *Staphylococcus aureus* small colony variant (*S. aureus* SCV) in comparison to other bovine strains. *Veterinary Microbiology* 137:326-334.

6. Atyabi, N. (2010). Milk in: Veterinary clinical pathology laboratory methods. (Second Edition). University of Tehran press 291- 297

7. Borne, B.H.P.V., Vernooij, J.C.M., Lupindu, A.M., Schaik, G.V., Frankena, K., Lam, T.J.G.M and Nielen, M. (2011). Relationship between somatic cell count status and subsequent clinical mastitis in Dutch dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 102:265-273.

8. Brown, C.A., Rischette, S.J and Schultz, L.H. (1986). Relationship of milking rate to somatic cell count. *Journal of Dairy Science* 69:850-854.

9. Coelho, S.M.O., Pereira, I.A., Soares, L.C., Pribul, B.R and Souza, M.M.S. (2011). Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Dairy Science* 94(7):3305-3310.

10. Dinges, M.M., Orwin, P.M and Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 13:16-34.

11. Edmondson, P.W and Bramley, A.J. (2004). Mastitis. in: Bovine medicine disease and husbandry of cattle. Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, H., and R.G. Eddy. (Second Edition). Black Well 326-336.

12. Gao, J and Stewart, G.C. (2004). Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (*Spa*) Promoter. *Journal of Bacteriology* 186(12): 3738-3748.

13. Garvis, S., Mei, J., Ruiz, J and Holden, D.W. (2008). *Staphylococcus aureus* svrA: a gene required for virulence and expression of the agr locus. *Microbiology* 148:3235-3243.

14. Gilot, P., Lina, G., Cochard, T and Poutrel, B. (2002). Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. J*ournal of Clinical Microbiology* 40:4060-4067.

15. Haas, Y., Barkema, H.W., Schukken, Y.H and Veerkamp, R.F. (2005). Associations between somatic cell count patterns and the incidence of clinical mastitis. *Preventive Veterinary Medicine* 67:55-68.

16. Julio, C., Franco, G., González L.V., Sandra, C., Gómez, M., Juan, M., Carrillo, G., José, J and Ramírez, C. (2008). Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in México. eGnosis 6(7):1-7.

17. Kalorey, D.R., Shnmugam, T., Kurkure, N.V., Chousalkar, K.K and Barbudde, S.B. (2007). PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical cases. *Journal of Veterinary Science* 2:151-154.

18. Karahan, M and Çetinkaya, B. (2007). Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. Veterinary Journal 174:428-431.

19. Khan, M.Z and Khan, A. (2006). Basic Factors of mastitis in dairy animals: a review. *Pakistan Veterinary Journal* 26(4):204-208.

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

21. Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, G and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory molecule. *EMBO Journal* 12:3967-3975

22. Padhy, A., Sahu, A.R., Shekhar, S., Sahoo, S., Sahoo, A and Dalai, N. (2015). *Staphylococcus aureus*: an emergent cause of bovine mastitis in India - a review. *International Journal of Livestock Research* 5(2): DOI 10.5455/ijlr.20150212093551.

23. Palmqvist, N., Josefsson, E and Tarkowski, A. (2004). Clumping factor A-mediated virulence during *Staphylococcus aureus* infection is retained despite fibrinogen depletion. *Microbes and Infection* 6:196-201.

24. Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H.-M., Nürnberg, G and Schuberth, H.-J. (2008). *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary Researches* 39:18.

25. Sharma, N., Singh, N.K and Bhadwal, M.S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences* 24(3):429-438.

26. Smith, K.L., Hillertor, J.E and Harmon, R.J. (2001). Guidelines on normal and abnormal raw milk based on SCC and signs of clinical mastitis. National Mastitis Council.

27. Straub, J.A., Hertel, C and Hammes, W.P. (1999). A 23SrDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection* 62:1150-1156.

28. Traber, K.E., Lee, E., Benson, S., Corrigan, R., Cantera, M., Shopsin, B and Novick, R.P. (2008). agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 154:2265-2274.

29. Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Dapra`, V and Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis* 40(4):177-183.