مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره اول (پیاپی ۱۴) بهار ۱۳۹۲
صفحات ۱۳-۶

Original Article

جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* تولید کننده لیزواستافین، از ورم پستان گاوی و شناسایی آن بر اساس تعیین توالی 16S rRNA

سجاد یزدان ستاد[۱]*، مجید مقبلی[۲]، هاتف آجودانی فر[۲]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس سیمولانس* یک کوکسی گرم مثبت و خوشه ای می باشد که از پوست، ادرار و نمونه های بالینی انسان و حیوان به ویژه عفونت پستان گاوی جداسازی شده است. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* تولید کننده لیزواستافین، از ورم پستان گاوی و نیز معرفی آن به عنوان یک عامل درمانی جدید در درمان عفونت های *استافیلوکوکی* انجام شده است.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی نمونه های جمع آوری شده از پستان گاوهای مبتلا به عفونت پستان در گاوداری مرکز علمی و کاربردی جهاد کشاورزی واقع در کیلومتر۶ جاده چشمه علی دامغان، استان سمنان انجام گرفت. نمونه ها پس از کشت بر روی محیط نوترینت آگار با رنگ آمیزی گرم و آزمون های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از استخراج DNA از نمونه های مشکوک به *استافیلوکوکوس سیمولانس*، به منظور شناسایی دقیق باکتری و بررسی وجود ژن لیزواستافین در سویه از روش PCR و تعیین توالی استفاده گردید.

یافته ها: از مجموع ۶۱ کوکسی گرم مثبت خوشه ای جداشده از نمونه های ورم پستان گاوی، یک مورد باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* شناسایی گردید. تعیین توالی قطعه 16S rRNA باکتری نیز صحت جداسازی را تأیید نمود.

نتیجه گیری: با توجه به اولین گزارش جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* از ورم پستان گاوی در ایران و نیز کارایی بالقوه لیزواستافین تولید شده توسط باکتری، می توان از این ترکیب در درمان عفونت های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس سیمولانس*، لیزواستافین، ورم پستان گاوی، 16S rRNA.

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۱

مقدمه

باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* (*Staphylococcus simulans*) یک کوکسی گرم مثبت خوشه ای، غیر متحرک و فاقد اسپور می باشد که در پوست، ادرار و نمونه های بالینی انسان و حیوان وجود دارد (۱). بیووار استافیلولیتیکوس این باکتری، قادر به تولید یک اندوپپتیداز خارج سلولی به نام گلایسیل گلایسین (لیزواستافین) می باشد. این آنزیم موجب هیدرولیز پل های متقاطع پپتیدوگلیکان دیواره سلولی دیگر *استافیلوکوک ها* به ویژه *استافیلوکوکوس اورئوس* (*S. aureus*) می گردد (۴-۲). با توجه به افزایش مقاومت و کاهش اثر

* آدرس برای مکاتبه: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، بخش میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۴۴۲۶۳۸۶۴ پست الکترونیک: sajjad.yazdansetad@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های *استافیلوکوکی*، مطالعات تحقیقاتی بر روی ارزیابی لیزواستافین به عنوان یک عامل درمانی نوین برای عفونت های استافیلوکوکی در حال انجام است (۷-۵). هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* تولید کننده لیزواستافین، از ورم پستان گاوی و نیز معرفی این باکتری به عنوان عامل درمانی جدید در درمان عفونت های استافیلوکوکی به منظور انجام مطالعات بیشتر بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه گیری: در این مطالعه مقطعی-توصیفی نمونه گیری از گاوداری مرکز علمی کاربردی جهاد کشاورزی واقع در کیلومتر ۶ جاده چشمه علی دامغان در استان سمنان انجام گرفت. تمامی گاوهای مورد بررسی در این پژوهش مبتلا به بیماری ورم پستان بودند (۸). در ابتدا با استفاده از سوآب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی، از چندین ناحیه پستان شامل نوک، پوست و شیر پستان عفونی نمونه گیری به عمل آمد. سپس نمونه ها بر روی محیط نوترینت آگار کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند.

ب) غربال گری سویه های باکتری: به منظور خالص سازی کلنی های رشد یافته بر روی محیط نوترینت آگار، باکتری ها مجدداً بر روی محیط یاد شده کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. باکتری های رشد یافته به کمک آزمون های بیوشیمیایی عمومی و اختصاصی، مطابق با روش استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند (۱). همچنین کلنی های ایجاد شده از نظر شکل، رنگ، بو، قوام و اندازه ارزیابی گردیدند. در ادامه به منظور غربال گری کوکسی های گرم مثبت خوشه ای و اطمینان از خلوص آنها، رنگ آمیزی گرم از نمونه ها تهیه شد.

ج) جداسازی باکتری هدف: پس از غربال گری کوکسی های گرم مثبت خوشه ای، بر اساس جدول افتراقی *استافیلوکوک ها* برای هر یک از آنها آزمون های کاتالاز، اکسیداز، کوآگولاز، احیای نیترات، DNase، آزمون حساسیت به آنتی بیوتیک های نوبیوسین و پلی میکسین B، ONPG، و اوره آز با روش های استاندارد به عمل آمد (۱). پس از انجام آزمون های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، در مرحله بعد از آزمون های بیوشیمیایی استفاده گردید.

د) استخراج DNA: DNA باکتری مطابق با روش کادو (Kado) و لیو (Liu) در سال ۱۹۸۱ با اندکی تغییرات انجام گرفت (۹). پس از میکروفیوژ ۲ میلی لیتر از کشت تازه باکتری، به رسوب سلولی حاصل ۱۵۰ میکرولیتر محلول I (Tris-Acetate 40 mM , Sodium EDTA 2 mM , pH 7.9) و ۲۰۰ میکرولیتر محلول II (50 mM , SDS 3% , pH 12.6 Tris) اضافه گردید (۹). سپس باکتری های لیز شده با ۹۰۰ میکرولیتر محلول فنل-کلروفرم عصاره گیری شدند. با افزودن ایزوپروپانل، DNA از فاز آبی رسوب داده شد. پس از شستشو با اتانل، DNA ژنومی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. در نهایت، DNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد به مدت ۴۰ دقیقه در ۸۰ ولت الکتروفورز شد (۱۰).

ه) PCR ژن 16S rRNA: در این مطالعه به منظور تکثیر ناحیه 16S rRNA باکتری هدف از پرایمرهای عمومی (F: 5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3') و (R: 5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') استفاده گردید. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۲ میکرومولار $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Thermal Cycler PeQLab Primus 25-United Kingdom) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه

Archive of SID

www.SID.ir

انجام شد. در نهایت محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و به مدت ۱ ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید (۱۰).

و) تخلیص محصول PCR: محصول PCR با استفاده از کیت Nucleic Acid Extraction Kit–Vivantis خالص سازی شد. محصول تخلیص شده برای توالی یابی به شرکت ژن فن آوران (Genfanavaran, Iran) ارسال گردید.

ز) PCR ژن لیزواستافین: از آنجایی که باکتری جداسازی شده در این مطالعه (*استافیلوکوکوس سیمولانس*)، تنها باکتری تولید کننده آنزیم لیزواستافین می باشد، لذا در مرحله بعد به منظور شناسایی دقیق باکتری و بررسی وجود لیزواستافین در سویه از روش PCR استفاده گردید.

به منظور تکثیر ژن لیزواستافین (قطعه ۱۳۵۹ جفت بازی) از پرایمرهای اختصاصی برگرفته از سایت NCBI (NC_013944.1)، شامل (F: 5'-ATGGATGTTTCAAAAAAGTAGCTGAAGT-3' و R: 5'-TCACTTTATAGTTCCCCAAAGAACACC-3') استفاده شد. غلظت نهایی هر واکنش گر برای واکنش PCR دقیقاً مطابق با غلظت اشاره شده در واکنش فوق بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Thermal Cycler PeQLab Primus 25-United Kingdom) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۷/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در نهایت محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد واجد اتیدیوم برماید منتقل و الکتروفورز گردید.

یافته ها

الف) شناسایی باکتری: از مجموع کلنی های بررسی شده با رنگ آمیزی گرم، ۶۱ کوکسی گرم مثبت خوشه ای شناسایی گردید. از این میان تنها یک مورد باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* پس از انجام آزمون های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جداسازی شد (جداول ۱ و ۲).

جدول۱: نتیجه آزمون های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی باکتری *S. simulans*

فرم میکروسکوپی	کوکسی خوشه ای
نوع گرم	مثبت
فرم کلنی ها	کلنی های گرد با حاشیه صاف
قطر کلنی	به طور متوسط ۱ تا ۲ میلی متر
رنگ کلنی	سفید مایل به زرد
زمان رشد بهینه	۱۶ تا ۲۴ ساعت
رشد در شرایط هوازی	مثبت
رشد در شرایط بی هوازی	مثبت

جدول۲: نتایج آزمون های بیوشیمیایی به دست آمده از نمونه های ورم پستان گاوی

آزمون های بیوشیمیایی	تعداد نمونه جداسازی شده
کاتالاز مثبت	۵۰
اکسیداز منفی	۴۵
کوآگولاز منفی	۳۶
احیای نیترات مثبت	۲۹
DNase منفی	۲۰
حساسیت به نوویبوسین	۹
حساسیت به پلی میگسین B	۹
ONPG مثبت	۴
اوره آز مثبت	۱

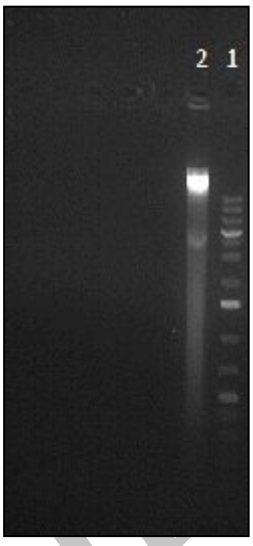
ب) تأیید استخراج DNA: الکتروفورز DNA استخراج شده از باکتری هدف، نشان دهنده ایجاد یک باند مشخص از DNA ژنومی به همراه یک باند احتمالی از DNA پلاسمیدی بود (شکل ۱).

ج) تأیید PCR ژن 16S rRNA: الکتروفورز محصول PCR با ایجاد باند خالص ۱۴۹۴ جفت بازی نشان دهنده تکثیر صحیح ژن 16S rRNA بود (شکل ۲).

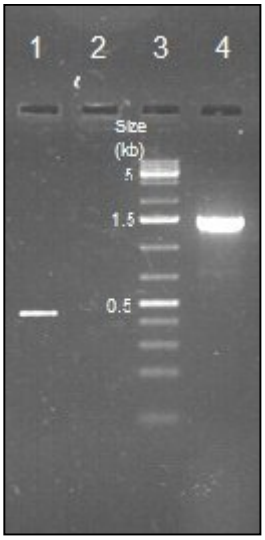
د) توالی تعیین ترادف شده قطعه 16S rRNA: تعیین توالی قطعه 16S rRNA تکثیر یافته باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* صحت جداسازی باکتری را تأیید نمود (شکل ۳).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱: تصویر الکتروفورز حاصل از DNA استخراج شده از باکتری *S. simulans* ستون ۱) سایز مارکر kb plus ۱، ستون ۲) DNA ژنومی و DNA پلاسمیدی.



شکل۲: تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA باکتری *S. simulans* ستون ۱) کنترل مثبت، ستون ۲) کنترل منفی، ستون ۳) سایز مارکر kb plus ۱، ستون ۴) باند ۱۴۹۴ جفت بازی نشان دهنده تکثیر صحیح ژن 16S rRNA در باکتری هدف.

ه) *تأیید PCR ژن لیزواستافین:* الکتروفورز محصول PCR، وجود ژن لیزواستافین را با ایجاد یک باند خالص ۱۳۵۹ جفت بازی تأیید کرد (شکل ۴).

بحث

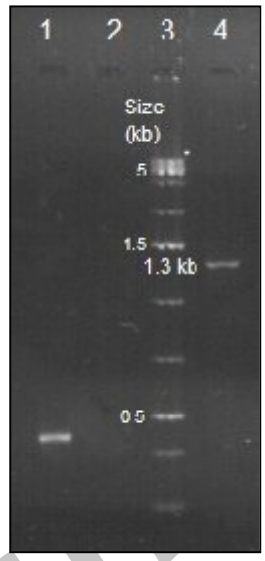
با وجود اینکه میزبان طبیعی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* مشخص نمی باشد (۱۱)، اما امروزه این باکتری علاوه بر انسان در حیوانات نیز جداسازی شده است (۱۲). این باکتری در حیوانات باعث بروز بیماری های مختلفی چون زخم های پوستی، ورم پستان گاوی، استئومیلیت (التهاب استخوان)، عفونت های دندانی و دستگاه های ثابت داخلی می گردد (۱۳). اهمیت باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* در تولید پپتیدهای ضد میکروبی است که می تواند در درمان عفونت های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک نقش بسیار مهمی را ایفا نماید (۱۴).

کلوس (Kloos) و شلیفر (Schleifer) در سال ۱۹۷۵، موفق به جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* از پوست سالم افراد ساکن در کارولینای شمالی و نیوجرسی شدند. آنها گونه

CATGGTACCCGCATGGTTTCATGATGAAAGACGGTTTTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCCTCGTATTAGCT
AGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCAACCTGAGAGGCCGATCGGCCACACTGGAA
CGTAGACACGGTCCAGACTCCTAGGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA
GCAACGCCGCGTGATTGATGAAGGTCTTAGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGTGCCAAGGATGTAAGT
AACTATGCATCCCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTAAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGTGATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGGCGTGAAAGC
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATG
TGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGACATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGTCTGCAACTGTCT
GATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA
GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCACTTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC
GAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
TCGCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGCCGTCTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAGTGGTCGGCTACATACGTGCTACAATGGACGGTACTAATA

شکل۳: توالی تعیین شده قطعه 16S rRNA باکتری *S. simulans*

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۴: تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن لیزواستافین در باکتری *S. simulans* ستون ۱) کنترل مثبت، ستون ۲) کنترل منفی، ستون ۳) سایز مارکر kb plus ۱، ستون ۴) باند ۱۳۵۹ جفت بازی نشان دهنده تکثیر صحیح ژن لیزواستافین.

ها را بر اساس ویژگی های ریخت شناسی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و حساسیت آنتی بیوتیکی از یکدیگر متمایز نمودند (۱۲).

در سال ۱۹۸۲، رابینسون (Robinson) و اسلوان (Sloan) باکتری *استافیلوکوکوس استافیلولیتیکوس* NRRL B-2628 (*Staphylococcus staphylolyticus*) که بیواری از *استافیلوکوکوس سیمولانس* می باشد را از پوست سالم افراد جداسازی کردند (۱۵). باریل (Burriel) و همکاران در سال ۱۹۹۷باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* را از شیر گوسفند مبتلا به ورم پستان، جدا نمودند. اما این باکتری در ناحیه پوست پستان و نوک پستان (Teat) شناسایی نگردید (۱۳). این مطالعه از نظر منبع جداسازی با پژوهش حاضر مغایرت دارد، اما از نظر اساس جداسازی یکسان می باشد. در سال ۱۹۹۸، آرسترایپ (Aarestrup) و همکاران، در نمونه گیری گسترده از گاوهای مبتلا به ورم پستان، چندین باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* را جداسازی نمودند (۱۶). در این مطالعه، پس از جمع آوری نمونه ها، از روش ریبوتایپینگ با استفاده از آنزیم برش دهنده *Eco*RI برای شناسایی باکتری استفاده شد که از نظر منبع جداسازی با مطالعه ما مطابقت داشت، اما از نظر اساس جداسازی مغایرت دارد.

کازابوری (Casaburi) و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطالعه ای را با هدف بررسی تکنولوژیکی سویه جدا شده از سوسیس به منظور یافتن استارتر مناسب در تولید سوسیس های خشک تخمیری انجام دادند (۱۷). این محققان موفق به جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* از سوسیس های تخمیری شدند. آنها در آزمون های بیوشیمیایی انجام شده، فعالیت احیاکنندگی نیترات، فعالیت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باکتری را مورد ارزیابی قرار دادند. پیورالا (Pyorala) و تاپونن (Taponen) در سال ۲۰۰۸، مطالعه ای را به منظور بررسی جنبه های عمومی عفونت درون پستانی ایجاد شده با باکتری های کواگولاز منفی و ارزیابی اهمیت آنها در شیر حیوان انجام دادند. آنها توانستند باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* را از ورم پستان گاوی جداسازی نمایند. با استناد به این مطالعه، باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* یکی از رایج ترین گونه های کواگولاز منفی جدا شده از نمونه های ورم پستان گاوی می باشد (۱۸). ما نیز در این پژوهش گاوهای مبتلا به ورم پستان را انتخاب و موفق به جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* از این نمونه ها شدیم.

نتیجه گیری

با توجه به توانایی باکتری *استافیلوکوکوس سیمولانس* در تولید لیزواستافین به عنوان یک عامل ضد میکروبی جدید و نیز اولین گزارش جداسازی این باکتری در ایران، پیشنهاد می گردد که در پژوهش های بعدی جنبه های مطالعاتی دیگری مانند جداسازی سویه های بومی بیشتر، بررسی تولید لیزواستافین باکتری و انتخاب بهترین سویه تولید کننده لیزواستافین، کلون سازی و بیان آنها در میزبان های مهندسی شده برتر مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی کارکنان و مسئولین

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایشگـاه های دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Bergey D, Breed R, Murray E, Ilitchens A. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 5th ed. Baltimore. Williams and Wilkins. 1939. P: 142-189.

2. Schindler C, Schuhardt V. Purification and properties of lysostaphin: a lytic agent for *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Acta. 1965; 97: 242-250.

3. Schindler C, Schuhardt V. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. Proc Natl Acad Sci USA. 1964; 51: 414-421.

4. DeHart H, Heath H, Heath L, LeBlanc P, Sloan G. The lysostaphin endopeptidase resistance gene (*epr*) specifies modification of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol. 1995; 61: 1475-1479.

5. Adegoke A, Komolafe A. Multi-drug resistant *Staphylococcusaureus* in clinical cases in Ile-Ife, Southwest Nigeria. Int J Med Sci. 2009; 1(3): 68-72.

6. Parsonnet J, Deresiewecz R, Braunwald E, Fauci AS. *Staphylococcal* infections. 15th ed. Harrison's Principles of Internal Medicine. 2001. P: 889- 901.

7. Bastos M, Coutinho BG, Coelho M. Lysostaphin: a *Staphylococcal* bacteriolysin with potential clinical applications. Pharmaceutic. 2010; 3(4): 1139-1161.

8. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen H, Pyorala S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative *staphylococci* identified with API or AFLP. Vet Microbiol. 2006; 115: 199-207.

9. Kado C, Liu S. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. 1981; 145: 1365-1373.

10. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. P: 245-299.

11. Kloos W. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Ann Rev Microbiol. 1980; 34: 559-592.

12. Kloos W, Schleifer K. Isolation and characterization of *staphylococci* from human skin II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. Int J Syst Bacteriol. 1975; 25: 62-79.

13. Angeliki R. Burriel. Isolation of coagulase-negative *staphylococci* from the milk and environment of sheep. J Dairy Res. 1998; 65: 139-142.

14. Heng N, Wescombe P, Burton J, Jack R, Tagg J. The diversity of bacteriocins in gram-positive bacteria. Springer: New York, NY, USA. 2007; P: 45-92.

15. Sloan G, Robinson J, Kloos W. Identification of '*Staphylococcus staphylolyticus*' NRRL B-2628 as a biovar of *Staphylococcus simulans.* lnf J Syst Bacteriol. 1982; 32: 170-174.

16. Aarestrup F, Larsen H, Jensen N. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains

Archive of SID

www.SID.ir

isolated from cases of bovine mastitis. Vet Microbiol. 1999; 66: 165-170.

17. Casaburi A, Blaiotta G, Mauriello G, Pepe O, Villani F. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. Meat Sci. 2005; 71: 643-650.

18. Pyorala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci: emerging mastitis pathogens. Vet Microbial. 2008; 134(1-2): 3-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 1, April 2013

Original Article

Isolation of *Staphylococcus simulans*, a lysostaphin-producing organism, from bovine mastitis and its identification based on 16S rRNA sequencing method

Sajjad Yazdansetad[1], Majid Moghbeli[2], Hatef Ajoudanifar[2]

[1] M.Sc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives: *S. simulans* is a gram-positive cocci that can be isolated from skin and urine, as well as some clinical samples in human and animals, such as bovine mastitis. The present study was aimed to isolate and identify *S. simulans*, a lysostaphin-producing organism, from bovine mastitis and to test therapeutic property of this species against the staphylococcal infections.

Materials and Methods: This cross- sectional study was done on the collected samples from breast of the cows afflicted to mastitis in Damghan, Semnan Province. The samples were cultured on nutrient agar and were examined based on Gram staining and biochemical tests. Then, the genomic DNA of the samples suspected for *S. simulans* were extracted. The accurate identification of the bacteria and tracking of lysostaphin gene were evaluated by using PCR and sequencing.

Results: One out of 61 gram-positive isolated cocci from bovine mastitis samples was detected as *S. simulans*. This result was verified using 16S rRNA sequencing.

Conclusion: This study is the first report of isolation of *S. simulans*, a lysostsphin-producing organism, from bovine mastitis. This species is potentially useful for extraction of lysostsphin which is applied for treatment of the infections caused by antibiotic resistance bacteria.

Keywords: *Staphylococcus simulans,* Lysostaphin, Bovine mastitis, 16S rRNA.

Correspondance to: Sajjad Yazdansetad

Tel: +989144263864

E-mail: sajjad.yazdansetad@gmail.com

Journal of Microbial World 2013, 6(1): 6-13.

www.SID.ir