

# الگوی ژن‌های حدت استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم

## پستان تحت بالینی و بالینی در استان البرز

هادی پورتقی\*

### چکیده

هدف از انجام مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های حدت در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی بود. جهت شناسایی موارد ورم پستان تحت بالینی تعداد ۱۹۲۰ کارتیه مربوط به ۴۸۰ گاو در هفت گاو‌داری در استان البرز به وسیله شیرآزما (CMT) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به کمک کشت باکتریایی موارد بالینی ورم پستان استافیلوکوکوس اورئوس نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس آزمایش کواگولاز و ژن 23srDNA به ترتیب تعداد ۳۳ و ۱۲ سویه استافیلوکوکوس اورئوس از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی جدا شدند. به کمک PCR که با استفاده از پرایمرهایی که برای ژن‌های فاکتور توده‌ای کننده (clfA)، کواگولاز (coa)، ناحیه X کد کننده پروتئین A (SpaA- X region)، ژن تنظیم کننده فرعی (agrIII)، همولیزین A (hla) و همولیزین B (hib)، انجام شد، استافیلوکوک‌های جدا شده از نظر ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به تنوع بالا در ژن‌های مورد مطالعه ۱۷ پروفایل مختلف در بین نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که این امر حاکی از تنوع بالا در استافیلوکوکوس اورئوس‌های دخیل در ورم پستان در این منطقه از کشور است. پروفایل غالب در بین موارد تحت بالینی و بالینی مربوط به clfA، coa، agrIII بود. نتایج این مطالعه امکان بررسی تنوع چند ژن حدت در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس شایع در ورم پستان‌های تحت بالینی و بالینی در استان البرز را فراهم کرده و ممکن است در جهت تبیین رویکردی پیشگیرانه در جهت کاهش عفونت ناشی از این باکتری کمک کننده باشد.

**واژگان کلیدی:** گاو شیری، استافیلوکوکوس اورئوس، ژن‌های حدت، ورم پستان بالینی و تحت بالینی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۲

### مقدمه

ورم پستان عبارت است از تورم غده پستانی بدون توجه به عامل ایجاد کننده آن که در دوره بیماری تغییراتی در بافت پستان و ترشحات آن دیده می‌شود. این مشکلات از نظر همبستگی با علل متفاوتی همراه بوده که حائز اهمیت‌اند و اصولاً تمام صورت‌های آن در اثر ضایعه‌ای که در پستان و مجرای کانال یا سینوس‌های شیر ایجاد می‌شود، به وقوع

می‌پیوندند (۹ و ۸). ورم پستان به فرم‌های حاد، تحت حاد، مزمن و تحت بالینی بروز می‌نماید. ورم پستان یک بیماری رایج در گاوهای شیری است. ورم پستان باعث آسیب‌های قابل توجه در صنایع لبنی می‌شود. در بین عوامل گوناگون ایجاد کننده ورم پستان، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) از همه بیماری‌زایی بیشتری داشته و باعث عفونت‌های مزمن سخت درمان شونده و یا ورم پستان‌های حاد می‌شود. باکتری استافیلوکوکوس اورئوس گسترش جهانی داشته و اغلب باعث ورم پستان‌های تحت بالینی و بالینی می‌شود. منبع اصلی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کارتیه آلوده است و انتقال بین گاوها طی شیردوشی انجام می‌گیرد. عوامل حدت گوناگونی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شناخته شده و در بروز اشکال مختلف ورم پستان ناشی از این باکتری نقش دارند. مطالعات حاکی از آن است که ارتباط مستقیمی ما بین حضور عوامل حدت و شدت ورم پستان وجود دارد (۱۰ و ۵). حضور این عوامل حدت در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت بوده و از نظر مطالعات اپیدمیولوژیک حائز اهمیت است.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس طیفی از فاکتورهای حدت را که توانایی کلونیزه شدن در بافت پستان را می‌دهد همانند کواگولاز، پروتئین A و همولیزین تولید می‌کند. پروتئین کواگولاز، توانایی تبدیل فیبرینوژن به فیبرین را با مکانیسمی متفاوت از تکوین لخته در بدن دارد. این پروتئین توسط ژن coa ایجاد می‌شود. ژن agr ساخت بسیاری از فاکتورهای حدت را طی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تنظیم می‌کند. سیستم agr مسئول کاهش تولید پروتئین‌های مرتبط با دیواره

\* گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران  
hadi.pourtaghi1@gmail.com

## مواد و روش کار

به منظور شناسایی کارتی‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در هفت گاوداری در استان البرز 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 سرپستان مطابق توصیه NMC داخل ظرف استریل جمع آوری شده و ظرف مدت حداکثر سه ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه به منظور شناسایی عامل ایجاد کننده ورم پستان تحت بالینی و همچنین بالینی با استفاده از کشت باکتریایی از محیط‌های کشت مکانیکی آگار (Mac Agar) و بلادآگار (Blood Agar) و بردپارکر آگار (Baird parker) ساخت شرکت مرک، استفاده شد. پس از کشت، باکتری‌هایی با کلنی‌های سفید با همولیز دوگانه بر روی بلادآگار و باکتری‌هایی با کلنی سیاه با هاله شفاف (چشم ماهی) بر روی بردپارکر از نظر جنس به عنوان استافیلوکوکوس در نظر گرفته شد و گونه آن از نظر اورئوس بودن با استفاده از آزمایش کوآگولاز مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش کوآگولاز ابتدا از کلنی‌های استافیلوکوکوس در محیط کشت پپتون واتر کشت تهیه شد و بعد از ۲۴ ساعت که به کدورت مناسبی رسید به نسبت یک به یک (برابر) با پلاسما سیتراته خرگوش در لوله آزمایش مخلوط شد و لخته شدن پلاسما در لوله رویت شد که این لخته شدن نشانگر این بود که گونه استافیلوکوکوس ایجاد کننده ورم پستان اورئوس است. همچنین از نمونه‌های ورم پستان بالینی ارجاعی به بیمارستان شماره یک دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و یا آزمایشگاه خصوصی پلاسما با استفاده از روش کشت باکتریایی اقدام به شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شد.

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

سلولی و مسئول افزایش پروتئین‌های ترش‌حی در طی اواخر دوره سکون رشد باکتری در آزمایشگاه است. لوکوس *agr* شامل دو واحد نسخه برداری منشعب تحت کنترل دو پروموتور P2 (RNA II) و P3 (RNA III) می‌باشد. نسخه P3 باعث تنظیم مثبت فاکتورهای حدت ترش‌حی و موجب تنظیم منفی پروتئین‌های سطحی می‌شود. 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. این پروتئین توسط ژن Spa با یک ناحیه پلی مورفیک (X) و ناحیه ثابت کد می‌شود. ناحیه متغیر X حاوی تعداد تکرار متغیری از ۲۴ جفت باز است. همولیزین آلفا و بتا با آسیب به غشا سیتوپلاسمی باعث آسیب سلول‌ها می‌شوند. توکسین بتا، اسفنگومیلیناز وابسته به یون منیزیم است که اسفنگولپید غشا سیتوپلاسمی را تجزیه می‌کند. این توکسین‌ها توسط ژن‌های *hla* و *hlb* کد می‌شوند (۴).

بین ژن‌های حدت و بخصوص *coa* و ورم پستان در گاو، رابطه مستقیمی وجود دارد (۱۱) و همچنین ژن‌های حدت *clfA* و *SpaA X-region* از پروتئین A در استافیلوکوکوس اورئوس در گسترش و شدت ورم پستان دخیل می‌باشند (۱۶ و ۲). در مطالعه‌ای درباره جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از ورم پستان و بررسی ژن‌های حدت آن، فراوانی ژن *coa* از ۱۹ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان ۵۳٪ (۱۰) نمونه بود (۱۵ و ۱۲). در مطالعات دیگر نیز مشخص شد در همه نمونه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از ورم پستان، تمام ژن‌های حدت به صورت یکنواخت و یکسان وجود ندارند مثلاً در ۴۰۲ نمونه شیر ۶۸ نمونه دارای ژن *clfA* و ۵۳ نمونه دارای ژن *nuc* و ۴۱ نمونه دارای ژن *coa* بود (۱۰).

هدف از انجام مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های حدت در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی می‌باشد.

الگوی ژن‌های حدث استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی در استان البرز

استفاده شد و در نهایت ۲/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده با روش جوشاندن به عنوان الگو به لوله اضافه شد. آنالیز واکنش PCR مربوط به ژن‌های 23srDNA و *clfA* و *SpaA* و *agrIII* و *hla* و *hbl* شامل پرایمرهای مربوطه، سیکل‌های تکثیر و منابع مربوطه در جدول انمایش داده شده است. پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد. محصولات تولید شده به این ترتیب با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۱٪/۱/۵ تهیه شده در بافر TBE (۸۰ میلی مول تریس، ۸۹ میلی مول بوریک اسید، ۲/۵ میلی مول EDTA) جداسازی شده و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و از باندها عکس تهیه شد. از مارکر ۱۰۰-۲۰۰۰ bp سیناژن برای تعیین اندازه قطعات استفاده شد. در نهایت ارتباط بین حضور ژن‌های حدث *clfA* و *coa* و *SpaA*- X region و *agrIII* و *hla* و *hbl* در باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس با شکل ورم پستان (تحت بالینی یا بالینی) مورد بررسی قرار گرفت. در نگاره ۱ و ۲ محصول مربوط به دو واکنش Multiplex PCR نمایش داده شده است.

۴۰۰ میکرولیتر آب قطر استریل مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد (۱۴). 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 حدث مربوط به عامل *clfA* (clumping factor) و *cao* (coagulas) و *agrIII* (accessory gene و *SpaA* X-region (Protein A) regulator) و *hla* (alpha hemolysin) و *hbl* (beta hemolysin) 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 ۲ میکرولیتر زوج پرایمرها (با غلظت ۱۰ pmol/μl)، ۰/۶ میکرولیتر *dntp* (با غلظت ۱۰ mmol/L)، ۳ میکرولیتر از بافر PCR (با غلظت ۱۰ X)، ۱/۸ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub> (با غلظت ۲۵ mmol/L)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم DNA Polymerase tag (با غلظت ۵ U/μl)، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر عاری از DNase

جدول ۱- پرایمرهایی که برای تشخیص ژن‌های حدث در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان به کار رفتند.

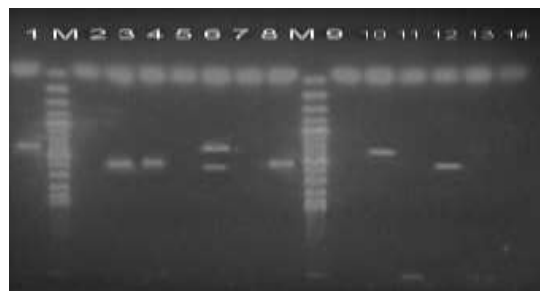
منبع	اندازه محصول (bp)	برنامه PCR <sup>a</sup>	سکانس پرایمر (۵' به ۳')	ژن
۱۶	۱۲۵۰	۱	F: ACGGAGTTACAAAGGACGAC R: AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	23srDNA
۱۰	۷۱۰، ۹۱۰	۲	F: ATAGAGATGCTGGTACAGG R: GCTTCCGATTGTTCGATGC	<i>coa</i>
۱۰	۱۰۴۲	۲	F: GGCTTCAGTGCTTGTAGG R: TTTTCAGGGTCAATA TAAGC	<i>clfA</i>
۱۰	۲۲۰، ۲۵۳، ۳۱۵	۳	F: CAAGCACCAAAAAGAGGAA R: CACCAGGTTTAACGACAT	<i>SpaA-X</i>
۷	۳۲۳	۴	Pan: ATGCACATGGTGCACATGC R: GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCAG	<i>agrIII</i>
۱	۲۱۰	۵	F: CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R: CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT	<i>hla</i>
۱	۳۰۰	۵	F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	<i>hbl</i>

a: ۱ = ۳۵ × (۹۴°C ۴۰-s, ۶۴°C ۶۰-s, ۷۲°C ۷۲-s); ۲ = ۳۵ × (۹۴°C ۶۰-s, ۵۸°C ۶۰-s, ۷۲°C ۶۰-s); ۳ = ۳۰ × (۹۴°C ۶۰-s, ۶۰°C ۶۰-s, ۷۲°C ۶۰-s); ۴ = ۲۶ × (۹۴°C ۳۰-s, ۳۰°C ۳۰-s, ۷۲°C ۶۰-s); ۵ = ۳۰ × (۹۴°C ۶۰-s, ۵۰°C ۶۰-s, ۷۲°C ۶۰-s)

## نتایج

تعداد ۱۹۲۰ نمونه شیر از ۱۹۲۰ کارتیبه مربوط به ۴۸۰ گاو از تعداد هفت گاوداری در استان البرز جمع آوری شد. در مجموع تعداد ۶۲ نمونه باکتری استافیلوکوکوس جداسازی شد که با استفاده از آزمایش کوگولاز و PCR بر روی ژن 23srDNA تعداد ۳۳ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس شناخته شد. همچنین از نمونه‌های ارجاعی به کلینیک در مجموع ۱۲ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دیگر جداسازی شد که در مجموع ۴۵ نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی جداسازی شد.

در ۴۵ نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی ۱۶ پروفایل ژنی مختلف دیده شد. طبق نتایج شایع‌ترین پروفایل ژن‌های حدت مربوط به *clfA*, *coa*, *agrIII* بود که هم در موارد ورم پستان بالینی و هم در موارد ورم پستان تحت بالینی مشاهده شد. در جدول ۲ پروفایل ژن‌های حدت در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی نشان داده شده است.



نگاره ۱- ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به ژن‌های حدت *coa* و *clfA* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. حفره‌های ۱ و ۱۰ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *coa* با باندی به اندازه ۷۱۰ جفت باز و حفره‌های ۳، ۴، ۶ و ۱۲ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *clfA* با باندی به اندازه ۱۰۴۲ جفت باز. حفره ۶ مربوط به نمونه مثبت از نظر هر دو ژن حدت *coa* و *clfA* می‌باشد. حفره‌های ۲، ۵، ۷، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۴ نمونه‌های منفی. M: مارکر ۲۰۰۰-۱۰۰.



نگاره ۲- ژل آگاروز ۱/۵٪ مربوط به ژن‌های حدت *hla* و *hlb* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. حفره‌های ۷ و ۱۳ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *hla* با باندی به اندازه ۲۱۰ جفت باز و حفره‌های ۹ و ۱۲ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *hlb* با باندی به اندازه ۳۰۰ جفت باز. حفره‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۰ و ۱۱ نمونه‌های منفی. M: مارکر ۲۰۰۰-۱۰۰.

جدول ۲- پروفایل ژن‌های حدت در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی

شماره پروفایل	پروفایل ژن‌های حدت	ورم پستان	تعداد جدایه‌ها	درصد
۱	<i>clfA</i> , <i>coa</i> , <i>SpaA</i> , <i>agrIII</i> , <i>hla</i>	بالینی	۱	۲/۲۲
۲	<i>clfA</i> , <i>coa</i> , <i>SpaA</i> , <i>agrIII</i>	بالینی	۲	۴/۴۴
۳	<i>clfA</i> , <i>coa</i> , <i>SpaA</i> , <i>agrIII</i> , <i>hla</i> , <i>hlb</i>	بالینی	۲	۴/۴۴
۴	<i>clfA</i> , <i>coa</i> , <i>agrIII</i>	بالینی، تحت بالینی	۸	۱۷/۷۷
۵	<i>clfA</i> , <i>SpaA</i> , <i>agr III</i> , <i>hla</i> , <i>hlb</i>	بالینی	۱	۲/۲۲
۶	<i>clfA</i> , <i>SpaA</i> , <i>agrIII</i> , <i>hla</i>	بالینی	۲	۴/۴۴
۷	<i>clfA</i> , <i>coa</i> , <i>agrIII</i> , <i>hlb</i>	تحت بالینی	۱	۲/۲۲
۸	<i>clfA</i> , <i>coa</i> , <i>agrIII</i> , <i>hla</i>	تحت بالینی	۳	۶/۶۶
۹	<i>clfA</i> , <i>SpaA</i> , <i>agrIII</i> , <i>hlb</i>	تحت بالینی	۳	۶/۶۶
۱۰	<i>clfA</i> , <i>agrIII</i>	تحت بالینی	۳	۶/۶۶

الگوی ژن‌های حدث استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی در استان البرز

۶/۶۶	۳	تحت بالینی	<i>clfA, agrIII, hla</i>	۱۱
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	<i>SpaA, hlb</i>	۱۲
۲/۲۲	۱	تحت بالینی	<i>coa, SpaA, agrIII</i>	۱۳
۱۱/۱۱	۵	تحت بالینی	<i>coa, SpaA</i>	۱۴
۱۳/۳۳	۶	تحت بالینی	<i>SpaA</i>	۱۵
۶/۶۶	۳	تحت بالینی	<i>clfA, SpaA, agrIII</i>	۱۶
۱۰۰	۴۵	جمع		

آنالیز سکانس ژن *SpaA* می‌تواند به عنوان سیستم جایگزین برای تایپینگ مولکولی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به کار رود (۶). در مطالعه Coelho و همکاران بر روی ژن *SpaA* برای هر جدایه یک محصول PCR وجود داشت که شایع‌ترین سایز مربوط به ۲۵۰ جفت باز در ۱۰ جدایه (۳۸٪) و ۲۸۰ جفت باز در ۹ جدایه (۱۴٪) و ۱۸۰ جفت باز در ۸ جدایه (۴۷٪) بود (۴). ولی در مطالعه حاضر ژن *SpaA* در ۲۵ جدایه (۵۵/۵٪) از ۴۵ جدایه باکتری حضور داشت جالب اینکه در مطالعه حاضر، تمام جدایه‌هایی که از نظر ژن *SpaA* مثبت بودند دارای محصولی با اندازه ۳۱۵ جفت باز بودند. که حاکی از این امر است که جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق دارای توانایی بالایی جهت ایجاد ورم پستان بالینی بودند.

همولیزین آلفا و همولیزین بتا مهمترین فاکتورها در بیماری-زایی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد کننده عفونت‌های داخل پستانی است (۴). در مطالعه حاضر از ۴۵ نمونه ۱۷ نمونه دارای ژن همولیزین بودند که ۹ نمونه دارای ژن همولیزین آلفا و ۵ نمونه دارای ژن همولیزین بتا و ۳ نمونه دارای هم ژن آلفا و هم ژن بتا بودند (توان همولیز دوگانه) و ۶۲/۲٪ از کل نمونه‌ها فاقد ژن همولیزین بودند. جالب اینکه در ۶ جدایه از ۱۲ جدایه (۵۰٪) از باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان بالینی یکی از ژن‌های همولیزین دیده می‌شود در حالی که میزان حضور ژن‌های همولیزین در بین

در ۱۲ نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان بالینی، ۶ پروفایل ژنی مختلف دیده شد. طبق نتایج شایع‌ترین پروفایل ژن‌های حدث در موارد ورم پستان بالینی مربوط به *clfA, coa, agrIII* بود و در مرحله بعد پروفایل‌های *clfA, coa, SpaA, agrIII* و *clfA, coa, SpaA, agrIII, hla, hlb* و *SpaA, agrIII, hla, hlb* بیشتر مشاهده شدند. در ۳۳ نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی ۱۱ پروفایل ژنی مختلف دیده شد. طبق نتایج شایع‌ترین پروفایل ژن‌های حدث در موارد ورم پستان تحت بالینی مربوط به *SpaA* بود و در مرحله بعد به ترتیب پروفایل‌های *coa, SpaA, clfA, coa, agrIII* بیشتر مشاهده شدند.

## بحث

هدف از انجام مطالعه حاضر شناسایی ژن‌های حدث در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی بود. حضور ژن‌های مختلف در بین استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از مناطق مختلف متفاوت بوده و این امر باعث اعطا توانمندی‌های مختلف جهت ایجاد بیماری در این باکتری می‌شود (۱۰). Frenay و همکاران اعلام کردند که ژن *SpaA* با محصول بزرگتر از ۲۶۰ جفت باز، بیشتر مربوط به جدایه‌های با توان ایجاد ورم پستان اپیدمیک است تا جدایه‌های با توانایی ایجاد ورم پستان انفرادی. تنوع و ثبات در این ژن حاکی از آن است که

تحت بالینی و بالینی ۱۶ پروفایل ژنی مختلف دیده شد که شش پروفایل ژنی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان بالینی و ۱۱ پروفایل ژنی در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی دیده شد. طبق نتایج، شایع‌ترین پروفایل ژن‌های حدت در ۴۵ باکتری جدا شده از ورم پستان‌های بالینی و تحت بالینی مربوط به *clfA*, *coa*, *agrIII* با فراوانی ۱۷/۷۷٪ بود. جالب اینکه پروفایل ژنی مذکور در ۱۲ باکتری مسبب ورم پستان بالینی نیز شایع‌ترین پروفایل با فراوانی ۳۳/۳۳٪ بود، در حالی که در ۳۳ باکتری جدا شده از موارد تحت بالینی، شایع‌ترین پروفایل، مربوط به ژن *SpaA* با فراوانی ۱۸/۸٪ گزارش گردید که این موضوع نشان‌دهنده افزایش حضور ژن‌های حدت از طریق افزایش قدرت بیماری‌زایی استافیلوکوکوس اورئوس بود که باعث تغییر الگوی ورم پستان از حالت تحت بالینی به ورم پستان بالینی می‌گردد.

این نتایج نشان دهنده آن است که باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای ژن‌های حدت مختلفی هست و همه فاکتورهای حدت در همه استافیلوکوکوس اورئوس‌های جدا شده از ورم پستان به صورت یکسان فعال نمی‌باشد (۱۰).

در مطالعه حاضر سه پروفایل غالب در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی و بالینی عبارت بود از پروفایل ۴ و ۱۵ و ۱۴ با به ترتیب فراوانی ۱۷/۷٪، ۱۳/۳٪ و ۱۱/۱٪ که در مجموع این پروفایل‌ها ۴۲٪ از جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند که هر سه این پروفایل‌های غالب فاقد ژن‌های *hla* و *hly* بودند، درصد پایین حضور ژن‌های همولیزین در این جدایه‌ها نشانگر کم اهمیت بودن این ژن‌ها نیست بلکه این نشانگر لزوم حضور ژن‌های تنظیم‌کننده‌ای همانند *agrIII* می‌باشد که باعث تنظیم مثبت این ژن‌ها می‌شود (۱۳). بقیه جدایه‌ها (۵۸٪) دارای ۱۳ پروفایل متفاوت بودند که این

باکتری‌های ایجادکننده ورم پستان تحت بالینی ۱۰ جدایه از ۳۳ جدایه (۳۰/۳٪) می‌باشد.

در مطالعه‌ای از ۱۱۷ نمونه مثبت که از روی مورفولوژی کلنی‌ها و همچنین با استفاده از پرایمر ژن اختصاصی جنس (23srDNA) استافیلوکوکوس اورئوس تایید گردید حضور سه ژن حدت hemolysin/clumping factor/capsule مورد بررسی قرار گرفت. از این ۱۱۷ نمونه ۷۵ نمونه دارای ژن همولیزین بودند که ۱۴ نمونه دارای ژن همولیزین آلفا و ۳۴ نمونه دارای ژن همولیزین بتا و ۴۴ نمونه دارای هم ژن آلفا و هم ژن بتا بودند (توان همولیز دوگانه) و تنها ۲۲٪ از کل نمونه‌ها فاقد ژن همولیزین بودند. همچنین ۳۶ نمونه دارای ژن کپسول و ۳۱٪ فاقد این ژن بودند و تعداد ۸۵ نمونه دارای ژن *clfA* بودند (۶). واکنش بین همولیزین آلفا و همولیزین بتا باعث افزایش قدرت چسبیدن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به سلول‌های اپیتلیال شده و در نتیجه امکان تکثیر باکتری را فراهم می‌سازد (۳). در مطالعه حاضر در بین ۱۲ باکتری ایجادکننده ورم پستان بالینی ۳ جدایه (۲۵٪) دارای هر دو ژن همولیزین آلفا و همولیزین بتا به طور توأم بودند در حالی که در هیچ یک از باکتری‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی این دو ژن به صورت توأم حضور نداشت.

در مطالعه‌ای در برزیل بر روی ۵۰ باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که از ۱۵ مزرعه جمع‌آوری شده بود. تمام جدایه‌ها دارای ژن *coa* با سه اندازه متفاوت محصول PCR بودند. محصول ژن *SpaA* برای نمونه‌های مثبت دارای محصول PCR به اندازه ۳۱۵ جفت باز بود. در بین جدایه‌ها به ترتیب ۲۴٪ و ۱۶٪ از نظر ژن *hla* و *hly* مثبت بودند، که بیان شده تعداد ۲۲ پروفایل متفاوت در بین نمونه‌ها نشانگر تنوع وسیع در استافیلوکوکوس اورئوس‌های ایجادکننده ورم پستان در این منطقه است (۴). در مطالعه حاضر در ۴۵ نمونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از موارد ورم پستان



8. Huijps, K., Lam, T.J., Hogeveen, H. (2008): Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy. Res.* 75:113-120.
9. International Dairy Federation. Bovine Mastitis. (1987): Definitions and guidelines for diagnosis. Dairy Federation. 211:3-8.
10. Kalorey, D.R., Shnmugam, T., Kurkure, N.V., Chousalkar, K.K., Barbudde, S.B. (2007): PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical cases. *J. Vet. Sci.* 2:151-154.
11. Karahan, M., Çetinkaya. B. (2007): Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Vet. J.* 174:428-431.
12. Khakpoor, M., Safarmashaei, S., Jafary, R. (2011): Study of milk extracted from cows related to *Staphylococcus aureus* by culturing and PCR. *Glob. Vet.* 7(6):572-575.
13. Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, G., Moghazeh, S. (1993): Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory molecule. *EMBO. J.* 12:3967-3975.
14. Pourtaghi, H., Sodagari, H.R. (2016): Antimicrobial resistance of enterotoxigenic and non-enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves in Iran. *Int. J. Enteric. Pathog.* 4(2):e34557. doi: 10.17795/ijep34557.
15. Sharma, N., Singh, N.K., Bhadwal, M.S. (2011): Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian. Australas. J. Anim. Sci.* 24:429-438.
16. Straub, J.A., Hertel, C., Hammes, W.P. (1999): A 23SrDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food. Prot.* 62:1150-1156.
- نشانهگر تنوع باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس مسبب ورم پستان در استان البرز می‌باشد.
- ### فهرست منابع
1. Adhikari, R.P., Cook, G.M., Lamont, I., Lang, S., Heffernan, H., Smith, J.M.B. (2002): Phenotypic and molecular characterization of community occurring, Western Samoan phage pattern methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:825-831.
  2. Akineden, O., Annemüller, C., Hassan, A.A., Lämmler, C., Wolter, W., Zschöck, M. (2001): Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:959-964.
  3. Bownik, A., Siwicki, A.J. (2008): Review paper: Effects of staphylococcal hemolysins on the immune system of vertebrates. *Centr. Eur. J. Immunol.* 33:87-90.
  4. Coelho, S.M.O., Pereira, I.A., Soares, L.C., Pribul, B.R., 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. *J. Dairy. Sci.* 94(7):3305-3310.
  5. Franco, G., Julio, C., González L.V., Sandra, C., Gómez, M., Juan, M., Carrillo, G., José, J., Ramírez, C. (2008): Virulence factors analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in México. *e-Gnosis.* 6(7):1-7.
  6. Frenay, H., Bunschoten, A.E., Schouls, L.M., van Leeuwen, W.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Verhoef, J., Mooi, F.R. (1996): Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein a gene polymorphism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:60-64.
  7. Gilot, P., Lina, G., Cochard, T., 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. Clin. Microbiol.* 40:4060-4067