

## بررسی فنوتیپ و ژنوتیپ ژن‌های همولیزین استافیلوکوکوس آرتوس‌های جدا شده از ورم پستان تحت بالینی در منطقه‌ی ساوجبلاغ، استان البرز

• آرش قاسم عزیزی (نویسنده مسئول)

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بروجرد، دانشکده علوم پایه،

گروه زیست‌شناسی، بروجرد، ایران

• مسعود حق خواه

گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

• هادی پور تقی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی،

گروه میکروبی‌شناسی، کرج، ایران

• علی شیرازی نژاد

بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز

• فاطمه ناصرپور

گروه میکروبی‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی دانشگاه بروجرد، بروجرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴-۰۹-۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵-۰۱-۲۹

Email: Dr.azizi86@gmail.com



### چکیده

استافیلوکوکوس آرتوس پاتوژن شناخته شده در حیوانات و انسان است که عفونت‌های مختلفی از جمله ورم پستان را در گاو، گوسفند و بز ایجاد می‌کند و همچنین باعث ایجاد درماتیت، مسمومیت و حتی در برخی موارد عفونت شدیدی مانند توکسیک شوک سندروم (TSS) در انسان می‌شود. این باکتری منجر به خسارت‌های شدید اقتصادی در صنایع لبنیات و همچنین باعث مرگ و میر می‌شود. چون این باکتری می‌تواند مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شود در نتیجه درمان را مشکل 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 آرتوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی در منطقه‌ی ساوجبلاغ (استان البرز) در سطح ۵۴۰ رأس گاو شیرده انجام شد. ابتدا کارتی‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی که با تست CMT تشخیص داده شده بود در آزمایشگاه کشت داده شد. نمونه‌های استافیلوکوکوس آرتوس با تایید تست 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 پستان 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 آرتوس معرفی شدند. بر روی این ۴۵ نمونه کشت در بلاد آگار و PCR انجام شد. نتایج حاصله نشان داد که در برخی نمونه‌ها، ژن‌های حدت همولیزین براساس کشت باکتری به خوبی بیان می‌شوند که تقریباً با نتایج حاصل از PCR هم‌پوشانی 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 کاملاً محرز می‌باشد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس آرتوس، 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., Department 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

بسیاری است (۴ و ۵). یکی از عوامل مهم حدت در استافیلوکوکوس آرتوس همولیزین‌ها می‌باشند که باعث کلونیزه شدن باکتری می‌گردند که انواع آلفا و بتا دارند. آلفا همولیزین بیشتر از نظر سایتوتوکسین‌های استاف آرتوس بررسی می‌شود (۶). سایتوتوکسیسیته 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 اندونوکلازاها فعال شده، سایتوکین‌هایی مثل اینترلوکین ۲ آزاد می‌شوند،

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 عمدتاً به علت کاهش تولید شیر، کیفیت پایین شیر و هزینه‌های زیاد تولید است (۱ و ۲). از بین تمام عوامل ورم پستان استافیلوکوکوس آرتوس مهم‌ترین عامل واگیر شناخته شده است (۳). این باکتری سلامتی گاو شیری را به شدت تهدید می‌کند (۴). انتقال این باکتری بین گاوها معمولاً 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

### انجام PCR برای تایید قطعی باکتری استافیلوکوکوس آرتوس

برای تایید قطعی استافیلوکوکوس آرتوس از روش مولکول PCR برای تکثیر ژن اختصاصی جنس rRNA ۲۳S 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  $100 \mu\text{L}$  از کدورت ایجاد شده با  $400 \mu\text{L}$  آب مقطر استریل مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در  $100$  درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. جهت انجام PCR، واکنش در حجم  $25 \mu\text{L}$  حاوی  $2 \mu\text{L}$  مخلوط جفت پرایمرها ( $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ )،  $0.6 \mu\text{L}$   $10 \text{ mM}$  (mMol/Liter) dNTPs،  $1 \mu\text{L}$   $10 \times$  PCR Buffer،  $1 \mu\text{L}$   $25 \text{ mM}$  (mMol/Liter) Taq DNA Polymerase ( $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ ) و  $0.3 \mu\text{L}$  آب مقطر استریل، انجام شد. سپس نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی مناسب انتقال داده شد (جدول ۱). پس از تصدیق از لحاظ Tube coagulase test و تکثیر ژن rRNA ۲۳S با سایز باند  $1250 \text{ bp}$  (شکل ۱) اقدام به مرحله بعدی و بررسی همولیز جداپه‌ها در محیط کشت گردید.

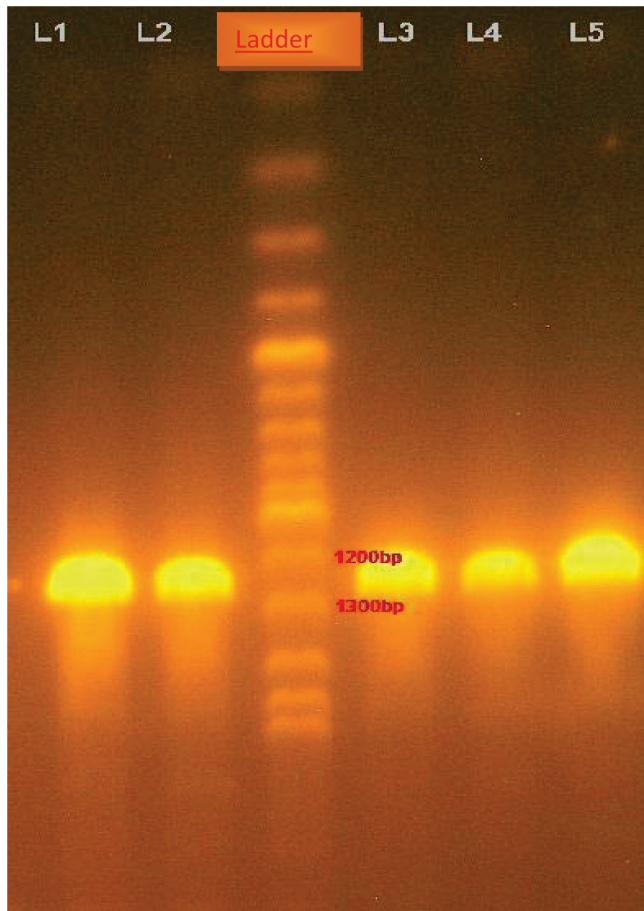
ساختمان غشاء تغییر می‌کند و مرگ سلول اپیتلیال رخ می‌دهد (۷ و ۸) بتا همولیزین با فعالیتی شبیه فسفولیپاز C به صورت اختصاصی باعث ایجاد شکافی در اسفنگو میلین غشاء سلولی می‌شود. این همولیزین hot cold lysis است. این عامل باعث نشت سلولی بوسیله لیز سلولی می‌شود. بتا همولیزین باعث آسیب به سلول‌های اپیتلیال پستانی گاو می‌شود (۹)، چسبندگی استاف آرتوس و همچنین تکثیر باکتری را افزایش می‌دهد و باعث افزایش آسیب به گاو بوسیله آلفا همولیزین می‌شود (۴). مطالعات مختلف ارتباط بین همولیزین‌های استاف آرتوس 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) ضمناً استافیلوکوکوس آرتوس 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. اخیراً 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 آرتوس‌های جدا شده از ورم پستان در منطقه‌ی ساوجبلاغ، استان البرز از طریق روش مولکولی PCR و بررسی فنوتیپ این ژن‌ها در محیط کشت بلا‌آگار می‌باشد.

### مواد و روش کار

#### شناسایی ورم پستان تحت بالینی و نمونه‌گیری

برای شناسایی کارتیبه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی از California Mastitis Test (CMT) برای  $540$  رأس گاوشیرده از ۸ گاوداری در منطقه‌ی ساوجبلاغ استان البرز استفاده شد. در مورد نمونه‌های کارتیبه 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 کارتیبه مقدار  $30$  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 استاندارد  $(20000 \text{ cell}/\text{ml})$  بالاتر بود، به عنوان ورم پستان تحت بالینی منظور گردید.

کشت و جداسازی عامل بیماری‌زا؛ 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 بلا‌آگار 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 آرتوس در نظر گرفته شدند.



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

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 rRNA ۲۳S با سایز ۱۲۵۰ جفت باز بودند (شکل ۱). در نتیجه تعداد ۴۵ نمونه به عنوان استافیلوکوکوس آرتوس تشخیص داده شد. از این ۴۵ نمونه استافیلوکوکوس آرتوس در محیط کشت آگار٪۵ 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 ژن hlb و hla (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 می‌شوند که تقریباً 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 کاملاً محرز می‌باشد.

### بحث

استاف آرتوس 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

### بررسی همولیزین در جدایه‌های استافیلوکوکوس آرتوس در محیط کشت و PCR

بعد از تایید نهایی استافیلوکوکوس آرتوس، 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 صورت hot-cold فعال می‌شود). سپس کلنی‌های ایجاد شده از لحاظ همولیزین‌های آلفا، بتا و گاما (عدم وجود همولیزین) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت تمام جدایه‌های استافیلوکوکوس آرتوس توسط روش مولکولی PCR از لحاظ وجود و عدم وجود ژن‌های حدت همولیزین با پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). برای این منظور روش مقاله فی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ 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 target DNA و ۲ μL مخلوط جفت پرایمرها (۲۰ μmol/mL)، ۲ mM dNTPs (۲ mM)، ۱۰ X PCR Buffer (۱۰۰ mM Tris, ۵۰۰ mM kcl)، ۳ μL، ۱۰۰ mM Taq/۵ μL، ۱۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۱۰۰-۱ Triton X، ۸،۴ HCL، PH DNA Polymerase (۵ μmol/ml) و ۱۵،۵ μL آب مقطر استریل، انجام شد. سپس مراحل حرارتی PCR توسط دستگاه ترموسایکلر با برنامه‌ی مناسب انتقال داده شد (جدول ۱). نمونه‌ها پس از الکتروفورز 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

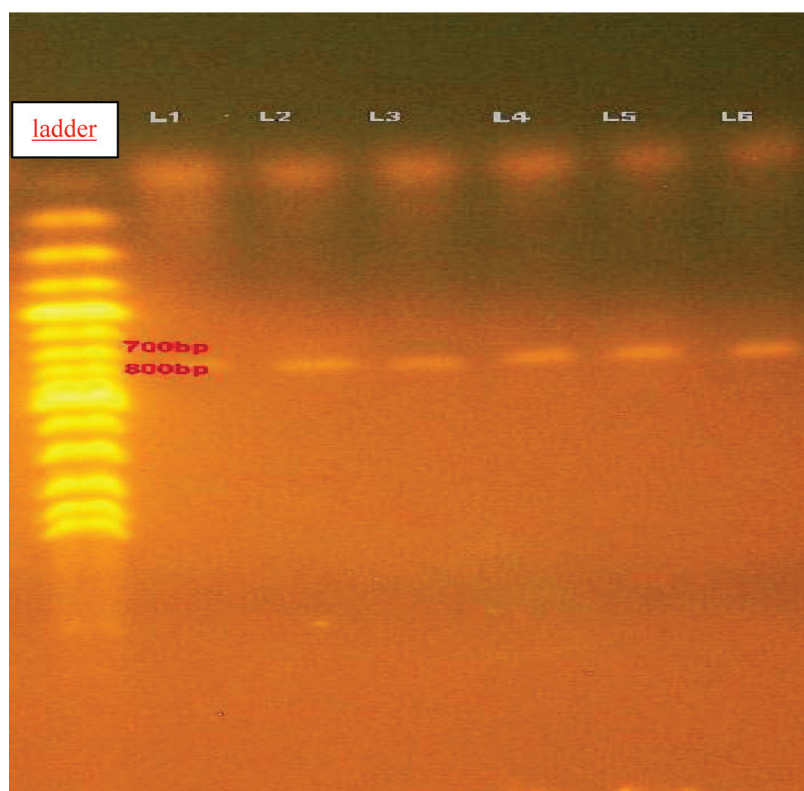
در این مطالعه از ۲۱۶۰ کارتیبه‌ای که مورد CMT قرار گرفت تعداد ۴۲۰ (٪۱۹،۴۵) کارتیبه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بود که از این تعداد

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- نمونه‌های مورد آزمایش L1 تا L5 دارای باند با طول 704bp برای ژن hlb

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 آرتوس* 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 ( $p < 0.05$ ) 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 سوی دیگر این مطالعه در ورم پستان تحت بالینی انجام شده است که احتمالاً در بیان بیشتر ژن hlb نقش بسزایی دارد. بطور کلی ژن همولیزین جزء ژن‌های پلی مورف است (۴) که برای تایپینگ *استافیلوکوکوس آرتوس*‌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.

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/اورتوس* 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/اورتوس* می‌باشند، 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 احتمالاً 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 می‌شود، نتیجه متفاوتی حاصل می‌شود (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 جولبو در سال ۲۰۰۸ و داسیلوا در سال ۲۰۰۵ بتا همولیزین،

جدول ۲- همولیزین ۵۴ نمونه *استافیلوکوکوس آرتوس* 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- ژن‌های همولیزین در ۵۴ نمونه *استافیلوکوکوس آرتوس* که توسط روش مولکولی PCR سنجش شده است.

| نوع ژن‌های همولیزین   | hla     | hnb         | hla+hnb | 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., Trantum, 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, Srivastava, 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, Trantum-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, Bramley A, J (1996), Effect of staphylococcal beta toxin on the cytotoxicity, 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.

