شناسایی مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس* در موارد ورم پستان تحت بالینی در مزارع گاو شیری شهرستان نیشابور

علی‌اکبر طوسی[١]، محسن نجیمی*[٢]، محمدجواد بهزادی شهربابک[٣]

١- دانش‌آموخته دکترای عمومی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٢- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
٣- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ١٣ دی ١۴٠١، بازنگری: ١٨ دی ١۴٠١، پذیرش نهایی: ١٨ دی ١۴٠١

چکیده

ورم پستان تحت بالینی یکی از معضلات شایع مزارع گاو شیری است که منجر به افت تولید و تحمیل خسارت اقتصادی به دامدار می‌شود. شناسایی پاتوژن‌های عامل ورم پستان تحت بالینی در هر منطقه برای پیشگیری و کنترل این معضل ضرورت دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان شیوع مولکولی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری شهرستان نیشابور بود. تعداد ۵۰۰ رأس گاو شیری از ١٣ مزرعه واقع در نقاط مختلف شهرستان نیشابور وارد مطالعه شدند. نمونه شیر از تمام کارتیه‌ها گرفته شد و از نظر ابتلا به ورم پستان تحت بالینی با استفاده از آزمون ورم پستان کالیفرنیایی بررسی شدند. از کارتیه‌هایی که در آزمون ورم پستان کالیفرنیایی مثبت بودند مجدداً نمونه شیر اخذ شد و از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شدند. از مجموع ۵۰۰ رأس گاو شیری مورد مطالعه (٢٠٠٠ کارتیه)، ٩۴ (١٨/٨ درصد) رأس مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بودند که آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در ٨ رأس شناسایی گردید. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی و همچنین شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* در بین موراد ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری شهرستان نیشابور پایین است.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، آزمون ورم پستان کالیفرنیایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: mnajimi@uoz.ac.ir

مقدمه

بیماری اورام پستان خسارت اقتصادی قابل توجهی را از راه افت تولید، کاهش کیفیت شیر و تهدید سلامت گاو به صنعت گاو شیری تحمیل می‌کند (۱). ورم پستان از نظر بروز علائم بالینی به دو نوع بالینی و تحت بالینی دسته‌بندی می‌شود. در ورم پستان بالینی تغییرات در شیر (رنگ و قوام شیر، وجود لخته)، تورم کارتیه و علائم عمومی ظاهر می‌شود (۲) در حالی که ورم پستان تحت بالینی هیچ‌یک از این علائم را ندارد اما تولید شیر را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد و در تمام گله‌های شیری ۲۰-۵۰ درصد گاوها را درگیر می‌کند (۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از شایع‌ترین عوامل ورم پستان در گاو شیری است و به سختی به درمان پاسخ می‌دهد و گاهی کارتیه درگیر تا پایان عمر عفونی باقی می‌ماند (۴). ورم پستانی که توسط این میکروارگانیسم ایجاد می‌شود به شدت واگیر است و به‌طور ویژه در زمان شیردوشی به کارتیه‌های سالم انتقال می‌یابد (۵). *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای فاکتورهای حدت شامل مولکول‌های چسبنده سطحی، همولیزین، آنزیم‌های کواگولاز و پروتئاز و سموم است که در بیماری‌زایی این پاتوژن نقش بسزایی دارند (۶). علاوه بر این *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند از عوامل ایمنی ذاتی و اکتسابی میزبان خود را در امان نگه دارد (۷). بررسی شیوع ورم پستان تحت بالینی در مزارع گاو شیری و همچنین شناسایی پاتوژن‌های عامل ورم پستان در هر منطقه برای تعیین استراتژی‌های پیشگیری و مدیریت بهداشتی گله‌های شیری ضرورت دارد. اخیراً تمایل زیادی به استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تشخیص و شناسایی پاتوژن‌ها در شیر ورم پستانی وجود دارد (۸، ۹). هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری در شهرستان نیشابور و همچنین تعیین سهم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری این منطقه به روش PCR است.

مواد و روش‌ها

بررسی شیوع ورم پستان تحت بالینی: تعداد ۱۳ مزرعه در سطح شهرستان نیشابور به طور تصادفی انتخاب شد و بسته به جمعیت آن از تعدادی از گاوهای هر گله نمونه‌برداری شد. برای ارزیابی از نظر ورم پستان تحت بالینی توسط آزمایش ورم پستان کالیفرنیایی (CMT) در مجموع از ۵۰۰ رأس گاو شیری (۲۰۰۰ کارتیه) نمونه شیر گرفته شد. نمونه‌گیری در وعده شیردوشی ظهر و پس از آماده‌سازی کارتیه‌ها شامل شستشو، خشک کردن و رگ‌زنی و قبل از اتصال دستگاه شیردوشی انجام می‌شد. پس از دور ریختن دو دوشش اول، دوشش سوم هر کارتیه درون گوده‌های ظرف مخصوص CMT ریخته می‌شد. سپس به اندازه حجم نمونه معرف CMT (KERBL California Mastitis Testing Liquid، شرکت کربل، آلمان) به شیر افزوده و هم زده می‌شد. پس از ۳۰ ثانیه نتیجه آزمایش بر اساس تغییرات مخلوط قرائت می‌شد. طبق مطالعه Kandeel و همکاران (۱۰) بر حسب تشکیل یا عدم تشکیل توده‌ی ژله‌ای و شکل و قوام آن نتیجه آزمایش منفی (-)، ناچیز (Trace)، یک مثبت (+)، دو مثبت (++) و سه مثبت (+++) ارزیابی می‌شد. عدم هرگونه غلیظ شدگی و تشکیل ژل در مخلوط نشانه منفی، غلیظ شدگی بسیار مختصر نشانه ناچیز و تشکیل توده کمی غلیظ، توده غلیظ، و توده‌ای که ژلاتینی است و با تکان دادن ظرف حرکت داده نمی‌شود به‌ترتیب نشانه +، ++ و +++ بود. هر سه حالت +، ++ و +++ نشانه ابتلای کارتیه به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد. در سطح گاو، گاوی که در آزمایش CMT حداقل یک کارتیه آن واکنش مثبت داشت مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در نظر گرفته شد.

بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در موارد ورم پستان تحت بالینی: از کارتیه‌هایی که در آزمایش CMT مثبت ارزیابی شدند پس از ضد عفونی نوک سرپستانک به‌وسیله پنبه الکل، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر

درون لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل جمع‌آوری شد. نمونه‌های اخذ شده تا زمان انجام آزمایش درون فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای استخراج DNA از روش جوشاندن استفاده شد (۱۱) به این صورت که حجم ۱ میلی‌لیتر از نمونه با رعایت شرایط استریل به میکروتیوب منتقل و با دور ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ شد، پس از دور ریختن مایع رویی ۱ میلی‌لیتر بافر TRIS EDTA به آن اضافه و ورتکس شد و مجدداً مورد سانترفیوژ قرار گرفت. مایع رویی دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه و ورتکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانترفیوژ شد و مایع رویی که حاوی DNA مورد نظر بود با رعایت شرایط استریل به میکروتیوب جدید منتقل شد.

برای انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی سنتز شده توسط شرکت پیشگام که در جدول۱ توالی آن آمده استفاده شد. مخلوط PCR از ۲ میکرولیتر محلول DNA استخراج شده به علاوه ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۸ میکرولیتر master mix و ۴ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. محتویات mastermix به‌صورت استاندارد شامل بافر، dNTPS، Taqpolymerase و $Mgcl_2$ می‌باشد که در نهایت پرایمرها و DNA الگو و آب مقطر استریل برای رساندن به حجم نهایی اضافه شد. مخلوط نهایی طبق مراحل ذکر شده در جدول۲ درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت.

پس از انجام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی ۱ میکرولیتر رنگ safe stain به مدت ۸۰ دقیقه تحت تأثیر ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد.

جدول۱- توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر

Target	Oligonucleotide	Sequence (5′-3′)	product size (bp)
S. aureus	STAA-AUI-F	TCTTCAGAAGATGCGGAATA	۴۲۰
	STAA-AUII-R	TAAGTCAAACGTTAACATACG	

F: forward R: reverse

جدول۲- مراحل انجام PCR

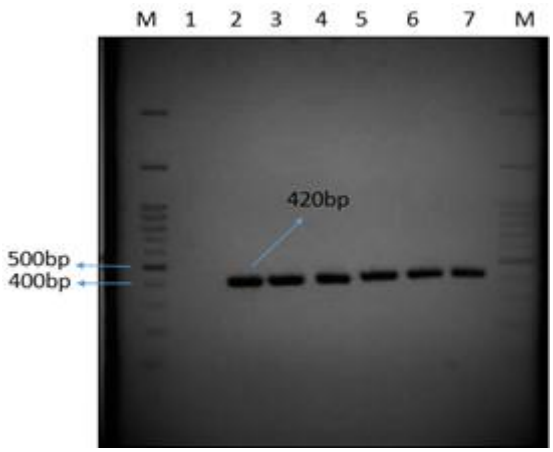
واسرشتگی اولیه	۲۴۰sec	۹۴°C
واسرشتگی	۳۰sec	۹۴°C
اتصال پرایمر به DNA	۳۰sec	۵۴°C
طویل شدن رشته الگو	۳۰sec	۷۲°C
طویل شدن نهایی	۳۰۰sec	۷۲°C

نتایج

بر اساس نتایج آزمایش CMT از ۵۰۰ رأس گاو بررسی شده (۲۰۰۰ کارتیه) تعداد ۹۴ رأس (۱۲۴ کارتیه) مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بودند. در ۸ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش PCR شناسایی شد. در جدول۳ میزان ابتلا به ورم پستان تحت بالینی و همچنین میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در هریک از گله‌های مورد مطالعه نشان داده شده است.

جدول۳- میزان ابتلا به ورم پستان تحت بالینی و میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در هریک از گله‌های مورد مطالعه

شماره گله	تعداد گاوهای مولد گله	تعداد گاوهای بررسی شده	تعدادگاوهایCMT مثبت	تعداد گاوهای باعفونت پستانی*S.aureus*
۱	۴۰۰	۴۰	۱۲	-
۲	۲۰۰	۳۵	۶	۱
۳	۱۵۰	۳۰	۴	-
۴	۲۵۰	۴۰	۵	-
۵	۳۰۰	۴۰	۱۲	-
۶	۱۵۰	۳۵	۸	۲
۷	۱۲۰	۳۰	۶	-
۸	۲۰۰	۴۰	۹	۱
۹	۴۵۰	۴۰	۱۴	۲
۱۰	۳۵۰	۴۰	۱۲	۱
۱۱	۲۰۰	۳۵	۸	-
۱۲	۳۰۰	۴۰	۱۲	۱
۱۳	۱۱۰۰	۵۵	۱۶	-
مجموع	۴۱۷۰	۵۰۰	۹۴	۸



شکل ۱- ستون **M** مارکر از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز می‌باشد. ستون شماره ۱ کنترل منفی و ستون شماره ۲ کنترل مثبت، وزن باند۴**bp**

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج آزمایش CMT در مطالعه حاضر میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در گاوهای شیری شهرستان نیشابور ۱۸/۸ درصد و در سطح کارتیه‌ها ۶/۲ درصد بود. این میزان وقوع در مقایسه با نتایج برخی مطالعات مشابه در ایران نسبتاً پایین است. سجادی و همکاران (۱۲) در ارزیابی میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در گاوداری‌های اطراف مشهد میزان کارتیه‌های CMT مثبت را ۷۴/۵۲ درصد گزارش کردند. همچنین هاشمی و همکاران (۱۳) میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی را در گاوداری‌های استان فارس در سطح گاو ۴۲/۵ درصد و در سطح کارتیه‌های مورد بررسی ۲۱/۶ درصد گزارش کردند. اما مطالعاتی نیز میزان وقوع پایین ورم پستان تحت بالینی را در مزارع ایران گزارش کرده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر نزدیک هستند. نقشینه و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۱۴) طی یک ارزیابی سه ساله از ۸۶۹ گاو شیری

مربوط به یک مزرعه صنعتی در آذربایجان شرقی میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی را در سطح گاو ۲۰/۸۳ درصد و در سطح کارتیه ۲۳/۷۱ درصد گزارش نمودند. همچنین پسرکلو و همکاران در سال ۱۴۰۱ (۱۵) میزان ۲۶/۶ درصد وقوع ورم پستان تحت بالینی را در گاوهای شیری استان گرگان گزارش دادند. برخی از مطالعاتی که به بررسی میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در سایر کشورها پرداخته‌اند میزان ۱۹ درصد در فنلاند (۱۶)، ۵۰/۴ درصد در روآندا (۱۷)، ۸۶/۲ درصد در اوگاندا (۱۸)، ۲۸/۳۴ درصد در اتیوپی (۱۹)، ۷۴/۸۳ درصد در پاراگوئه (۲۰)، ۲۹ درصد در بنگلادش (۲۱) را گزارش نموده‌اند. ورم پستان بیماری پیچیده‌ای است که تحت تأثیر پارامترهای مختلف محیطی، مدیریتی، عوامل مربوط به حیوان و همین‌طور عوامل مربوط به ارگانیسم است. از آنجا که اثرات این عوامل بر تعداد سلول‌های سوماتیک شیر (SCC) در بین گله‌ها، مراحل شیردهی و نژادهای گاو متفاوت است، انتظار می‌رود شیوع ورم پستان در مکان‌های مختلف متفاوت باشد (۱۴). میزان پایین وقوع ورم پستان تحت بالینی در گله‌های شیری مورد مطالعه می‌تواند به دلیل رعایت بهداشت شیردوشی و مدیریت مناسب بستر و جایگاه در سطح مزارع شیری شهرستان نیشابور باشد. با توجه به رونق صنعت گاو شیری در این شهرستان و اینکه گله‌های مورد مطالعه نسبتاً گله‌های بزرگی (بیش از ۱۲۰ رأس مولد) بوده‌اند، آموزش و تجربه‌ی خوب پرسنل و مدیران مزارع می‌تواند در وضعیت نسبتاً مناسب پستان در مطالعه حاضر نقش داشته باشد.

بر اساس نتایج آزمایش PCR، ۶/۴ درصد کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مزارع مورد مطالعه از نظر آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت ارزیابی شدند. با توجه به اهمیت این پاتوژن تاکنون مطالعات زیادی به بررسی نقش آن در ایجاد ورم پستان تحت بالینی به روش‌های باکتری‌شناسی و مولکولی پرداخته‌اند. میزان آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس* در مطالعه حاضر در مقایسه با بسیاری از مطالعات مشابه پایین‌تر بوده است. در مزارع شیری استان فارس از ۶۹۴ کارتیه CMT مثبت بیشترین ارگانیسمی که در کشت جدا شد استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی (۱۹/۶ درصد) بودند (۱۳). همچنین به دنبال کشت ۵۶۱ نمونه شیر متعلق به کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری از ۵۱ درصد نمونه‌ها استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی جدا شد (۲۲). قربان پور و همکاران (۲۳) در ۲۵ درصد از نمونه‌های مربوط به کارتیه‌های CMT مثبت استافیلوکوکوس اورئوس را به روش مولکولی شناسایی کردند. مطالعات متعددی در سایر کشورها میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* را در ورم پستان تحت بالینی بررسی کرده‌اند که عمدتاً شیوع بالاتری نسبت به مطالعه حاضر گزارش نموده‌اند از جمله ۴۴/۵ درصد موارد در اتیوپی (۲۴)، ۴۱/۸ درصد در مصر (۲۵)، ۲۰/۶ درصد در روآندا (۱۷)، اما در مواردی از قبیل مطالعه Zaatout و همکاران (۲۶) (۵/۳ درصد در الجزایر) وIkiz و همکاران (۲۷) (۳/۳ درصد در ترکیه) میزان شیوع پایین‌تر نیز یافت شده است.

از آنجا که *استافیلوکوکوس اورئوس* یک پاتوژن واگیر است شیوع آن بستگی به رعایت بهداشت شیردوشی دارد. شیوع پایین این پاتوژن در موارد ورم پستان تحت بالینی مزارع نیشابور می‌تواند به دلیل رعایت بهداشت شیردوشی باشد. Sommerhäuser و همکاران شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* را در مزارع شیری آلمان قبل و بعد از بکارگیری نکات بهداشتی و کنترلی بررسی کرده‌اند و تأثیر قابل توجه رعایت نکات بهداشتی در شیردوشی در کنترل و محدود نمودن شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* را گزارش نموده‌اند (۲۸).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان وقوع ورم پستان تحت بالینی در مزارع شیری شهرستان نیشابور ۱۸/۸ درصد است که ۶/۴ درصد این موارد بر اساس بررسی مولکولی نمونه‌های CMT مثبت ناشی از پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* است. میزان وقوع پایین ورم پستان تحت بالینی و نیز شیوع پایین *استافیلوکوکوس*

اورئوس در مزارع شیری مورد مطالعه حاکی از رعایت اصول بهداشتی در سالن شیردوشی است که توانسته تا حد قابل قبولی پاتوژن‌های واگیر را کنترل کند. البته در این شرایط بایستی با رعایت اصول مدیریتی بستر و جایگاه از شیوع ورم پستان‌های بالینی ناشی از پاتوژن‌های محیطی پیشگیری نمود.

سپاسگزاری: این پژوهش در قالب پایان‌نامه نویسنده اول انجام شده است. از پرسنل محترم شبکه دامپزشکی شهرستان نیشابور که زمینه ارتباط با مزارع گاو شیری را برای انجام این تحقیق فراهم کردند سپاسگزاری می‌شود.

References

1- Hoque M, Das Z, Rahman A, Haider M, Islam M. Molecular characterization of Staphylococcus aureus strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. Int. *J. Vet. Sci.* Med. 2018; 6(1): 53-60.

2- Khasanah H, Setyawan HB, Yulianto R, Widianingrum DC. Subclinical mastitis: Prevalence and risk factors in dairy cows in East Java, Indonesia. *Vet. World*. 2021; 14(8): 2102.

3- Forsbäck L, Lindmark-Månsson H, Andrén A, Åkerstedt M, Svennersten-Sjaunja K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. *Animal*. 2009; 3(5): 710-7.

4- Hosseinzadeh S, Saei HD. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. Int. *J. Vet. Sci. Med*. 2014; 2(1): 27-34. [In Persion]

5- Ster C, Allard M, Boulanger S, Boulet ML, Mulhbacher J, Lafontaine D, *et al.* Experimental treatment of Staphylococcus aureus bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J. Dairy Sci*. 2013; 96(2): 1000-8.

6- Kot B, Szweda P, Frankowska-Maciejewska A, Piechota M, Wolska K. Virulence gene profiles in Staphylococcus aureus isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. *J. Dairy Res*. 2016; 83(2): 228-35.

7- Tuchscherr L, Löffler B, Buzzola FR, Sordelli DO. Staphylococcus aureus adaptation to the host and persistence: role of loss of capsular polysaccharide expression. *Future Microbiol*. 2010; 5(12): 1823-32.

8- Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen M, Pyörälä S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J. Dairy Sci*. 2009; 92(6): 2610-7.

9- Elsayed MS, Dawoud MA. Phenotypic and genotypic detection of virulence factors of Staphylococcus aureus isolated from clinical and subclinical mastitis in cattle and water buffaloes from different farms of Sadat City in Egypt. *Vet. World*. 2015; 8(9): 1051.

10- Kandeel S, Morin D, Calloway C, Constable P. Association of California mastitis test scores with intramammary infection status in lactating dairy cows admitted to a veterinary teaching hospital. *J. Vet. Intern. Med*. 2018; 32(1): 497-505.

11- Ahmed OB, Dablool A. Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in gram negative bacteria. Int. *J. Bioassays*. 2017; 6(4): 5347-9.

12- Sajadi SS-R, Khoramian B, Azizzadeh M, Farzaneh N. Evaluating the Accuracy of the Diagnosis of Subclinical Mastitis Using Lactate Dehydrogenase-Based Dipsticks. *J. Vet. Res*. 2021; 76(2): 260-7. [In Persion]

13- Hashemi M, Kafi M, Safdarian M. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. Iran. *J. Vet. Res*. 2011; 12(3): 236-241. [In Persion]

14- Naghshineh S, Rafat S, Shoja J, Moghaddam G, Ebrahimi M. Prevalence and Risk Factors of Subclinical Mastitis in Iranian Holstein Cows. Iran. *J. Appl. Anim. Sci*. 2015; 5(3): 569-574. [In Persion]

15- Pesarakloo M, Ahani Azari A, Danesh A. Prevalence and Antibiotics Resistance Patterns of Common Bacterial Causes of Bovine Subclinical mastitis in Selected Dairy Farms of Gorgan, North-east of Iran. *Vet. Res. & Biol Prod.* 2022; 35(1): 101-6. [In Persion]

16- Hiitiö H, Vakkamäki J, Simojoki H, Autio T, Junnila J, Pelkonen S, *et al.* Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Vet. Scand*. 2017; 59(1): 1-14.

17- Mpatswenumugabo J, Bebora L, Gitao G, Mobegi V, Iraguha B, Kamana O, *et al.* Prevalence of subclinical mastitis and distribution of pathogens in dairy farms of Rubavu and Nyabihu districts, Rwanda. *J. Vet. Med*. 2017; 2017; 1-8.

18- Abrahmsén M, Persson Y, Kanyima BM, Båge R. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop. Anim. Health Prod*. 2014; 46(1): 99-105.

19- Tezera M, Aman Ali E. Prevalence and associated risk factors of Bovine mastitis in dairy cows in and around Assosa town, Benishangul-Gumuz Regional State, Western Ethiopia. *Vet. Med. Sci*. 2021; 7(4): 1280-6.

20- Rodríguez Jara LM. Prevalence of Subclinical Mastitis in Dairy Farm in Paraguay. *Rev. Med. Vet*. 2020; (40): 61-8.

21- Islam M, Islam M, Rahman M, Islam M. Prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in selected areas of Bangladesh. *BJAS*. 2011; 9(1): 73-8.

22- Mahzounieh M, Zadfar G, Maqami S, Shams N. Bacteriological and epidemiological aspects of mastitis in arak area dairy herds (IRAN). *Acta Vet. Scand*. 2003; 44(1): 1-15. [In Persion]

23- Ghorbanpour M, Seyfiabad Sm, Motamedi H, Jamshidian M, Gouraninezhad S. Comparison of PCR and bacterial culture methods for diagnosis of dairy cattle's subclinical mastitis caused by Staphylococcus aureus. *J.Vet.Res*. 2007; 62(4): 87-91. [In Persion]

24- Abera M, Demie B, Aragaw K, Regassa F, Regassa A. Isolation and identification of Staphylococcus aureus from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. *J. Vet. Med. Anim. Health*. 2010; 2(3): 29-34.

25- Elhaig MM, Selim A. Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae in domestic bovids from Ismailia, Egypt. *Trop. Anim. Health Prod*. 2015; 47(2): 271-6.

26- Zaatout N, Ayachi A, Kecha M, Kadlec K. Identification of staphylococci causing mastitis in dairy cattle from Algeria and characterization of Staphylococcus aureus. *J. Appl. Microbiol*. 2019; 127(5): 1305-14.

27- Ikiz S, BAŞARAN B, BİNGÖL EB, Cetin Ö, KAŞIKÇI G, ÖZGÜR NY, *et al.* Presence and antibiotic susceptibility patterns of contagious mastitis agents (Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae) isolated from milks of dairy cows with subclinical mastitis. *Turkish J. Vet. Anim. Sci*. 2013; 37(5): 569-74.

28- Sommerhäuser J, Kloppert B, Wolter W, Zschöck M, Sobiraj A, Failing K. The epidemiology of Staphylococcus aureus infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol*. 2003; 96(1): 91-102.

Molecular identification of *Staphylococcus aureus* in cases of subclinical mastitis in dairy cattle farms of Neyshabur city

Ali Akbar Toosi[1], Mohsen Najimi[*2], Mohammad Javad Behzadi-Shahrbabak[3]

1- Graduated in doctor veterinary medicine, Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Iran.
2- Associate professor, Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Assistant professor, Department of clinical science, Faculty of veterinary medicine, University of Zabol, Zabol, Iran.

Receive: January 3, 2023; Revise: January 8, 2023; Accept: January 8, 2023

Summary

Subclinical mastitis is one of the common problems of dairy farms, which leads to a decrease in production and economic damage to the farmers. Identification of the pathogens causing subclinical mastitis in each region is necessary to prevent and control this problem. The aim of this study was to investigate the molecular prevalence of *Staphylococcus aureus* bacteria in subclinical mastitis cows in dairy farms of Neyshabur city. A total of 500 milking cows from 13 dairy farms located in different parts of Neyshabur city were included in the study. Milk samples were taken from all quarters and checked for subclinical mastitis using the California mastitis test. Milk samples were taken from the quarters that were positive in the California mastitis test, and evaluated for contamination with *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. Out of 500 dairy cows studied (2000 quarters), 94 (18.8%) had subclinical mastitis, and *Staphylococcus aureus* infection was detected in 8 cows (8 quarter). Based on the results of this study, the occurrence rate of subclinical mastitis as well as the prevalence of *Staphylococcus aureus* among subclinical mastitis cows in dairy farms of Neyshabur city is low.

Keywords: *Staphylococcus aureus, California mastitis test, Polymerase chain reaction*