تعیین عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از اورام پستان گاو

سپیده کریمی[۱]، حسن ممتاز*[۲]

۱- دانش آموخته ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

دریافت مقاله: ۲ تیر ۱۳۹۷، بازنگری: ۲۵ تیر ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ۱۳۹۷

چکیده

ورم پستان گاو یکی از بیماری‌های شایع در گله گاوهای شیری است که توسط عوامل عفونی مختلفی از جمله کلبسیلا پنومونیه ایجاد می‌شود. مطالعه حاضر با هدف ردیابی این باکتری در موارد اورام پستان بالینی و تحت بالینی در گاو و بررسی عوامل بیماری‌زایی این باکتری انجام شد. درمجموع ۱۳۰ نمونه شیر از گاوهای شیری مبتلا به اورام پستان در گاوداری‌های سطح استان چهارمحال و بختیاری اخذ و پس از کشت میکروبی و تایید مولکولی ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه جدا شده، حضور شایع‌ترین عوامل حدت در این ایزوله‌ها به روش PCR ارزیابی شد. از ۱۳۰ نمونه شیر مورد آزمایش، تعداد ۳۰ نمونه (۱۵/۳۸ درصد) آلوده به کلبسیلا پنومونیه بودند که در این ایزوله‌ها اکثر عوامل حدت در بیماری‌زایی جرم ردیابی شد طوری که ژن‌های fimH و papC با فراوانی ۹۰ و ۶۵ درصد شایع‌ترین و ژن focDE/sfa با حضور ۱۵ درصدی نادرترین ژن حدت ردیابی شده در این ایزوله‌ها بود. حضور انواع فاکتورهای حدت در ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه نشان‌گر دخالت مستقیم این عوامل دربیماری‌زایی باکتری بوده و لازم است جهت شناسایی بیماری‌زا بودن کلبسیلا توزیع حضور عوامل حدت مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *استان چهارمحال و بختیاری، فاکتورهای حدت، کلبسیلا پنومونیه، ورم پستان گاو*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: hamomtaz@iaushk.ac.ir

مقدمه

ورم پستان گاو مسئول زیان‌های عمده اقتصادی در مزارع پروش گاو شیری در سراسر جهان است که خسارات ناشی از آن مربوط به کاهش تولید شیر، افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی و افزایش میزان مرگ و میر می‌باشد (۱). علاوه بر این، ورم پستان می‌تواند تهدیدی برای سلامت انسان باشد و عوامل مولد آن در قالب بیماری‌های زئونوز یا به شکل مسمومیت غذایی در انسان بروز پیدا کنند(۳، ۲). علاوه بر استافیلوکوک‌ها که شایع‌ترین عامل ایجاد ورم پستان گاو هستند، کلی‌فرم‌ها، انتروکوک‌ها و استرپتوکوک‌ها نیز اغلب از گاوهای مبتلا به ورم پستان جدا می‌شوند (۵، ۴). باکتری‌های گرم منفی به عنوان پاتوژن‌های مولد ورم پستان محیطی شناخته شده‌اند. انتقال باکتری‌های گرم منفی از غدد پستان گاوهای آلوده به گاوهای غیرعفونی به واسطه عوامل محیطی انجام می‌شود. کلی‌فرم‌ها به عنوان اصلی‌ترین عوامل مسبب ورم پستان محیطی بسیاری از زیستگاه‌های موجود در محیط گاو را اشغال می‌کنند. *اشریشیاکلی* جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش حیوانات خون‌گرم است. گونه‌های *کلبسیلا* و *انتروباکتر* از خاک، غلات، آب و روده حیوانات جدا می‌شوند . طول دوره ورم پستان کلی‌فرمی در بیش از ۵۰ درصد موارد حدود ۱۰ روز است ولی امکان طولانی شدن دوره بیماری به بیش از ۳۰ روز نیز وجود دارد. ورم پستان کلی‌فرمی در هر مرحله‌ای از زندگی گاو می‌تواند پستان را مبتلا نماید (۶). یکی از مهم‌ترین عوامل مولد ورم پستان کلی‌فرمی در گاو، *کلبسیلا پنومونیه* است. *کلبسیلا پنومونیه* یک پاتوژن فرصت‌طلب در انسان است که عمدتاً بیماران مبتلا به نقص ایمنی یا افراد سالمند به آن مبتلا می‌شوند. اخیراً گزارش شده است که سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با حدت زیاد قادر به ایجاد عفونت‌های کشنده در افراد سالم است (۷). *کلبسیلا پنومونیه* از حدت بسیار بالایی برخوردار است زیرا به طور طبیعی مجموعه ای از مواد شیمیایی محلول مانند ۱و۳ پروپرانیدول، ۲و۳ بوتانیدول و ۳ هیدروکسی پروپیونیک اسید را تولید می‌کند. مجموعه‌ای از عوامل از جمله پیلی، کپسول پلی‌ساکاریدی و لیپوپلی‌ساکارید دیواره باکتری در بیماری‌زایی این باکتری دخالت دارند (۸).

علی‌رغم مطالعات مختلف انجام شده روی بیماری‌زایی این باکتری در عفونت‌های انسانی، مطالعه جامعی در خصوص نقش عوامل حدت در بیماری‌زایی *کلبسیلا پنومونیه* در موارد ورم پستان گاو انجام نشده است. با توجه به حضور انواع عوامل حدت در *کلبسیلا پنومونیه* و نقش آن‌ها در پاتوژنز این باکتری، مطالعه حاضر باهدف بررسی الگوی ویرولانس در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان گاو انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با هدف تعیین عوامل بیماری‌زایی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان گاو به شرح زیر انجام گرفت:

نمونه گیری: ضمن هماهنگی با اداره دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری و مراجعه به فارم‌های صنعتی در سطح استان تعداد ۱۳۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به اورام پستان بالینی و تحت بالینی دارای نتیجه + تا + + + در آزمایش CMT اخذ گردید. نمونه‌های شیر در حجم ۲۰ میلی‌لیتر در ظروف استریل و از دو شش میانی پستان بعد از ضد عفونی کردن سرپستانک گرفته شد. نمونه‌های اخذ شده در مجاورت یخ و در اسرع وقت به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردید.

کشت و جداسازی باکتری کلبسیلا پنومونیه: نمونه‌های شیر ابتدا در محیط غنی‌کننده (TSBمرک –آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند سپس به صورت خطی در محیط جامد (EMB مرک -آلمان) کشت شدند. پرگنه‌های موکوئیدی لاکتوز مثبت انتخاب و پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم منفی درآن‌ها در محیط TSI و اوره کشت و آزمایش IMViC، روی آن‌ها انجام شد. پرگنه‌هایی که دارای واکنش + + – – در آزمایش IMViC، واکنش اسید/اسید در محیط TSI و اوره آز منفی بودند به عنوان پرگنه‌های *کلبسیلا پنومونیه* انتخاب شدند (۹). ایزوله‌های جداشده به منظور مطالعات بعدی در محیط TSB کشت و نگهداری شدند.

آزمایش‌های مولکولی: جهت استخراج DNA ژنومی از ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* رشد یافته در محیط TSB از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. برای این کار مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط TSB در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، مایع رویی به عنوان منبع DNA جدا و در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان گاو (۱۲)

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر('3-'5)	اندازه محصول (جفت باز)
afa/draBC	afa1 afa2	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	750
cnf1	cnf1 cnf2	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	498
cnf2	cnf2a cnf2b	AATCTAATTAAAGAGAAC CATGCTTTGTATATCTA	543
csgA	M464 M465	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	200
cvaC	ColV-CF ColV-CR	CACACACAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT	680
fimH	FimH F FimH R	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508
fyuA	FyuA f FyuA R	TGATTAACCCCGCGACGGGAA CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	880
ibeA	ibe10 F fibe10 R	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC TGGTGCTCCGGCAAACCATGC	170
iutA	AerJ F AerJ R	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300
kpsMT II	kpsII F kpsII R	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	272
PAI	RPAi F RPAi R	GGACATCCTGTTACAGCGCGCA TCGCCACCAATCACAGCCGAAC	930
papC	pap1 pap2	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	328
PapG II, III	pGf pGr	CTGTAATTACGGAAGTGATTTCTG ACTATCCGGCTCCGGATAAACCAT	1070
sfa/focDE	sfa1 sfa2	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410
traT	TraT F TraT R	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	290

جهت تأیید قطعی وجود ایزوله‌های جداشده آزمایش PCR، با استفاده از زوج پرایمرهای

ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT و

TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC،

جهت ردیابی ژن ITS۱۶ s-23s، انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. وجود قطعه ۱۳۰ جفت بازی تکثیر یافته در این واکنش نشان‌گر وجود *کلبسیلا پنومونیه* در ایزوله‌های مورد مطالعه بود (۱۱).

جهت ردیابی شایع‌ترین عوامل حدت در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جدا شده از موارد اورام پستان از زوج‌های پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ به روش PCR استفاده شد:

بسته به اندازه قطعه مربوط به هریک از ژن‌های فوق واکنش PCR در ۳ واکنش جداگانه طبق اجزاء و شرایط ذکر شده در جدول ۲ انجام شد:

جدول ۲- شرایط واکنش PCR جهت ردیابی عوامل حدت در *کلبسیلاپنومونیه*

شرایط PCR (حجم=۵۰ میکرولیتر)	برنامه حرارتی	نام ژن
۵ میکرولیتر =PCR buffer 10X ۱/۵ میلی مول =Mgcl2 ۲۰۰ میکرومول =dNTP mix پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۲۵ واحد ۴ میکرولیتر = DNA	۱ سیکل ۴ دقیقه ---------- **95°c** ۳۰ سیکل ۵۰ ثانیه ---------- **95°c** ۶۰ ثانیه ---------- **58°c** ۴۵ ثانیه ----------**72°c** ۱ سیکل ۸ دقیقه ----------**72°c**	afaldraBC , Cnd1 , CSgA , CVaC , iutA , fyu A
۵ میکرولیتر = PCR buffer 10X ۲ میلی مول =Mgcl2 ۱۵۰ میکرومول =dNTP mix پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۷۵میکرومول آنزیم پلی مراز = ۱/۲۵ واحد ۴ میکرولیتر = DNA	۱ سیکل ۶ دقیقه ---------- **94°c** ۳۴ سیکل ۵۰ ثانیه ---------- **95°c** ۷۰ ثانیه ---------- **58°c** ۵۵ ثانیه ----------**72°c** ۱ سیکل ۱۰ دقیقه ----------**72°c**	Cnfz kpSMTIT PAI PaPC
۵ میکرولیتر = PCR buffer 10X ۲ میلی مول =Mgcl2 ۲۰۰ میکرومول =dNTP mix پرایمرF و R مربوط به ژن = ۰/۵ میکرومول آنزیم پلی‌مراز = ۱/۵ واحد ۴ میکرولیتر = DNA	۱ سیکل ۴ دقیقه ---------- **95°c** ۳۴ سیکل ۶۰ ثانیه ---------- **94°c** ۴۵ ثانیه ---------- **56°c** ۶۰ثانیه ----------**72°c** ۱ سیکل ۱۰ دقیقه ----------**72°c**	fim H ibe A papG $\widehat{\text{II}}$, $\widehat{\text{III}}$ spal fac DE tra T

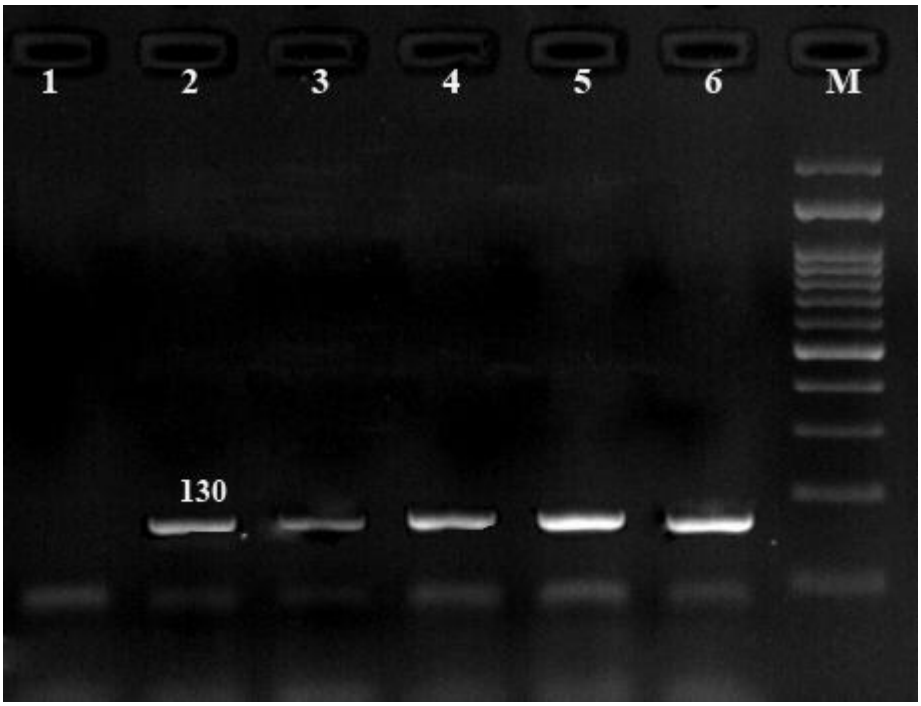
جهت ارزیابی محصول PCR در هرکدام از روش‌های فوق از الکتروفورز محصول PCR روی ژل ۲ درصد آگاروز استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت حدوداً ۶۰ دقیقه انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز با انتقال ژل به دستگاه قرائت‌کننده ژل(Gel Documentation)، نتیجه مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت آنالیز نتایج حاصل از انجام آزمایش و تعیین ارتباط بین فراوانی آلودگی به *کلبسیلاپنومونیه* و حضور انواع عوامل حدت در ایزوله‌های جدا شده از نرم‌افزار آماری SPSS ver. 18 و مدل‌های آماری مربع کای و دقیق

فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

از ۱۳۰ نمونه شیر اخذ شده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی تعداد ۲۰ نمونه (۱۵/۳۸درصد) آلوده به *کلبسیلاپنومونیه* بودند. ایزوله‌های جداشده در کشت میکروبی با ردیابی ژن S-23SITS۱۶ در آنها به روش PCR تائید شدند که ژل حاصل از ردیابی این ژن در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن S-23SITS۱۶ در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان در گاو (ستون =Mمارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱= نمونه کنترل منفی، ستون ۲= نمونه کنترل مثبت، ستون‌های ۳-۶= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۳۰ جفت بازی DNA)

در ایزوله‌های جداشده حضور شایع‌ترین ژن‌های کدکننده فاکتورهای حدت ارزیابی شد که نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

همان‌گونه که در جدول فوق مشهود است ۲۰ ایزوله *کلبسیلاپنومونیه* مورد مطالعه واجد اکثر عوامل حدت بوده و در این میان ژن‌های *fimH*، *PapC* با فراوانی ۹۰ و ۶۵ درصد شایع‌ترین و ژن *Sfa/focDE* با فراوانی ۱۵ درصد نادرترین ژن‌های حدت ردیابی شده در ایزوله‌های مورد مطالعه بودند.

در تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از جدول فوق، اختلاف آماری معنی‌داری بین حضور ژن‌های *cvaC*، *csgA*، *fyuA*، *ibeA*، *iutA*، *Sfa/focDE* با ژن‌های *fimH*، *kpsMTII*، *PapC*، *TraT*، *rpmA* در سطح اطمینان ۹۵ درصد (p= 0.038) مشاهده شد.

ژل حاصل از ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت مورد مطالعه در شکل ۲ آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

ورم پستان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در گاوهای شیری است که زیان‌های اقتصادی زیادی به ویژه در درمان گاوهای مبتلا ایجاد می‌کند. متداول‌ترین فرم ورم پستان، فرم تحت‌بالینی بیماری است که به علت نداشتن علایم ظاهری قابل

تشخیص نبوده و بیشترین خسارت را به صنعت دامپروری وارد می‌کند (۱۴، ۱۳).

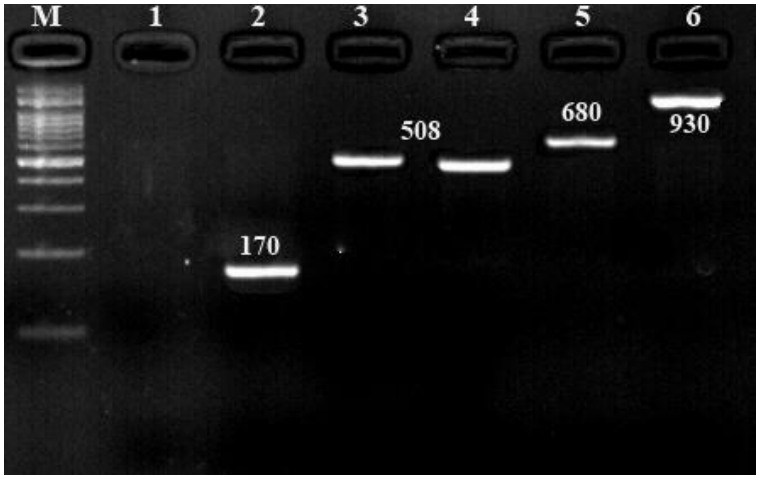
مطالعات مختلفی روی اشکال ورم پستان و عوامل مولد آن در گاوهای شیری در نقاط مختلف دنیا انجام شده و عوامل باکتریایی مختلف در گاوهای مبتلا به ورم پستان گزارش شده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین فروانی ورم پستان‌های ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

کلبسیلاپنومونیه یکی از شایع‌ترین عوامل مواد ورم پستان کلی فرمی در گاو است که در چند ساله اخیر اهمیت زیادی حتی بیشتر از *اشریشیاکلی* پیدا کرده است (۱۵).

Schukken و همکاران (۲۰۰۸) نسبت به افزایش حضور باکتری‌های *کلبسیلا* و *انتروباکتر* در مقایسه با *E. coli* هشدار داده است (۱۶). در مطالعه ما فراوانی ورم پستان‌های کلبسیلایی معادل ۱۵/۳۸ بود. در یک بررسی که در بازه‌ی زمانی ۱۰۰ روز اول پس از زایمان بر روی ۱۵۳ گاو مبتلا به ورم پستان بالینی انجام شد، ۴۰/۵ درصد از موارد ورم پستان از نوع کلی‌فرمی بودند که در ۴ مورد (۲/۶ درصد) *کلبسیلاپنومونیه* جدا گردید (۱۷).

جدول ۳- توزیع ژن‌های کدکننده عوامل حدت در ایزوله‌های *کلبسیلاپنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان در گاو

Gene	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	جمع کل
afa/draBC	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	۸
Cnf1	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	۱۱
Cnf2	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	۸
csgA	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	۷
cvaC	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	۶
fimH	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	۱۸
fyuA	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	۶
ibeA	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	۶
iutA	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	۶
kpsMTII	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	۱۲
Pal	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	۱۰
PapC	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	۱۳
papG II,III	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	۹
Sfa/focDE	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	۳
TraT	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	۱۲
rpmA	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	۱۲
WcaG	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	۱۰



شکل ۲- ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی تعدادی از ژن‌های حدت در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان در گاو (ستون =M مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون ۱= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۲-۶= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۷۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن ibeA، قطعه ۵۰۸ جفت بازی DNA مربوط به ژن fimH، قطعه ۶۸۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن cvaC، قطعه ۹۳۰ جفت بازی DNA مربوط به ژن PAI)

در تحقیق Shpigel و همکاران (۱۹۹۷) نیز کلی فرم‌ها با نرخ حضور ۶۰/۲ درصد نسبت به استرپتوکوک‌های محیطی، استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی و سایر گونه‌های غیر باکتریایی، بیشترین فراوانی را داشتند (۱۸). علت تفاوت در فراوانی حضور *کلبسیلا پنومونیه* در موارد ورم پستان بالینی یا تحت بالینی در مناطق مختلف به سطح بهداشت هر منطقه وابسته است و امروزه با پیشرفت سطح بهداشت گاوداری‌ها و رعایت اصول صحیح نگهداری و شیردوشی از دام، شیوع عوامل محیطی مولد ورم پستان از جمله *کلبسیلا پنومونیه* کاهش یافته است.

بروز ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در سه مرحله شامل ورود باکتری به داخل مجرای سر پستانک، چسبیدن باکتری به اپی‌تلیوم مجرای پستان و استفاده از مواد غذایی داخل پستان و نهایتاً تهاجم بافتی ایجاد می‌شود (۱۹). هر کدام از مراحل فوق با دخالت یک یا تعدادی از فاکتورهای حدت در باکتری شکل می‌گیرد.

به دنبال ورود باکتری چسبیدن باکتری به اپی‌تلیوم کانال‌های غدد پستانی با دخالت عوامل فیمبریال از جمله محصولات ژنی *papC*, *fimH* ,*papG* انجام می‌شود. در مطالعه ما فراوانی حضور ژن‌های فوق در ۲۰ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد ورم پستان گاو به ترتیب ۹۰، ۶۵ و ۴۵ درصد بود و دو ژن *fimH* و*papC* به‌عنوان شایع‌ترین ژن‌های کدکننده عوامل حدت شناسایی شدند. این یافته با مطالعات قبلی از جمله مطالعه Paulin-Curlee و همکاران (۲۰۰۷) هم راستا است و در مطالعه فوق نیز ژن *fimH* با فراوانی حضور ۸۶/۹ درصد شایع‌ترین ژن کدکننده عوامل حدت در *کلبسیلا پنومونیه* گزارش شده است (۲۰).

از اصلی‌ترین عوامل غذایی مورد نیاز باکتری جهت رشد در پستان، آهن است و باکتری‌های پاتوژن با دارا بودن عوامل جذب‌کننده آهن یا تولید سیدروفور، آهن مورد نیاز خود را تأمین می‌کنند. از جمله ژن‌های دخیل در تولید ترکیبات جذب‌کننده آهن، ژن‌های *kpsMTII*، *ibeA* و*iutA* هستند که در مطالعه حاضر ژن‌های فوق با فراوانی ۶۰، ۳۰، ۳۰ درصد ردیابی شدند.

در مطالعه Osman و همکاران (۲۰۱۴) ژن‌های حدت دخیل در پاتوژنز *کلبسیلا پنومونیه* ارزیابی

شـدند و ژن *kpsMTII* بـا فراوانـی ۳۶/۷ درصـد بـه عنوان اصلی‌ترین ژن کدکننده آیرون کلاتور گزارش شد (۲۱).

اصلی‌ترین فاکتور حدت در *کلبسیلا پنومونیه* که با قدرت تهاجمی باکتری در ارتباط است، تولید کپسول پلی‌ساکاریدی است که با دخالت نواحی ژنی cps در ژنوم باکتری ایجاد می‌شود. حضور ژن‌های cps در ارتباط با بیوسنتز کپسول پلی‌ساکاریدی در *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد. در این حالت ایجاد کلنی‌های موکوئیدی به دلیل وجود ژن‌های کدشونده کروموزومی rcs و مقاومت در برابر عوامل فاگوسیتوزی و سایر عوامل باکتریسیدال سرم به‌واسطه وجود ژن‌های کدشونده پلاسمیدی rpmA می‌باشد (۲۲).

سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در محیط کشت جامد تولید کلنی‌های بزرگ موکوئیدی می‌کنند. چسبندگی زیاد در این سویه‌ها به دلیل حضور چندین ژن از جمله ژن‌های megA، rmpA می‌باشد (۲۳).

در بسیاری از گزارش‌ها، نشان داده شده که ژن *rmpA* به عنوان عامل بیماری‌زا نقش دارد (۲۲). در حالی که مطالعات زیادی بر روی ژن *wcaG* به عنوان یک عامل حدت در مجموعه ژنی cps انجام نشده است. در مطالعه ما ژن‌های *rmpA* و *wcaG* با شیوع ۶۰ و ۵۰ درصدی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان ردیابی شدند که نشانگر دخالت این ژن‌ها به عنوان عوامل حدت اصلی در تولید کپسول پلی‌ساکاریدی و مقاومت *کلبسیلاپنومونیه* به فاگوسیتوز و عوامل باکتریسیدال سرم در پستان می‌باشد.

تهاجم بافتی به دنبال چسبیدن باکتری به سطوح اپی‌تلیال و مقاومت در برابر بیگانه‌خواری با تولید عوامل بیماری‌زای مختلف از جمله محصولات ژنی *cnf1* و*cnf2* شکل می‌گیرد. پروتئین‌های تولیدی از این ژن‌ها به کلونیزه شدن باکتری در اپی‌تلیوم پستان و تکثیر آن کمک می‌کنند و در مطالعه ما به ترتیب در ۵۵ و ۴۰ درصد از ایزوله‌های جدا شده از موارد اورام پستان ردیابی شدند. مطالعه انجام شده توسط Kanevsky-Mullarky و همکاران (۲۰۱۴) نشانگر صحت یافته فوق بود و در مطالعه فوق نیز ژن‌های *cnf1* و *cnf2* به عنوان عوامل اصلی کلونیزه شدن باکتری معرفی شدند (۲۴). در مجموع نتایج حاصل از مطالعه ما نشانگر فروانی نسبتاً بالای *کلبسیلا پنومونیه* در ایجاد ورم پستان‌های کلی‌فرمی درگاو بود و نشان داد که بیماری‌زایی باکتری با دخالت انواع مختلف فاکتورهای حدت شکل می‌گیرد و استفاده از آزمایش PCR به عنوان یک آزمایش دقیق و حساس جهت ردیابی ژن‌های حدت می‌تواند در شناسایی سریع باکتری‌های پاتوژن و برنامه‌ریزی صحیح جهت کنترل موارد اورام پستان در گاو و مدیریت صحیح گاوداری‌ها مفید باشد.

References

1- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? Vet J. 2006; 171(3):398-407.

2- Blum S, Heller ED, Krifucks O, Sela S, Hammer-Muntz O, Leitner G. Identification of a bovine mastitis Escherichia coli subset. Vet Microbiol. 2008; 132(1-2):135-48.

3- Fernandes JB, Zanardo LG, Galvão NN, Carvalho IA, Nero LA, Moreira MA. Escherichiacoli from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. J Vet Diagn Invest. 2011; 23(6):1146-52.

4- Smulski S, Malinowski E, Kaczmarowski M,
Lassa H. Occurrence, forms and etiologic agents of mastitis in Poland depending on size of farm. Med Weter. 2011; 67(3):190-3.

5- Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of

the potential role of microbial biofilms. Pathog Dis. 2016; 74(3). Pii: ftw006.

6- Hogan JS, Gonzalez RN, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW, *et al.* Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison, Wisconsin, USA: National Mastitis Council. Inc.; 1999. P.85-91.

7- Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumonia*e: a new and dangerous breed. Virulence. 2013; 4(2):107-18.

8- Kang Y, Tian P, Tan T. Research advances in the virulence factors of *Klebsiella pneumonia*e--A review. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2015; 55(10):1245-52.

9- Amos DB, Joklik WK, Wilfert CM, Willett HP. Zinsser microbiology. 20nd ed. Norwalk: Conn. Appleton Lange; 1992. P.569-76.

10- Shahriari F, Imamjomeh A. PCR, Introduction to bio techniques. 1nd ed. Mashhad: Imam Reza University; 2002. P.56-9. [In Persian].

11- Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). Feyz. 2017; 21(1):74-82. [In Persian].

12- Momtaz H, Jamshidi A. Shiga toxin producing Escherichia coli isolated from chicken meat in Iran: serogroups, virulencefactors, and antimicrobial resistance properties. Poult Sci. 2013; 92(5):1305-13.

13- Dobbins CN Jr. Mastitis losses. J Am Vet Med Assoc. 1977; 170(10 Pt 2): 1129-32.

14- Losinger WC. Economic impacts of reduced milk production associated with an increase in bulk-tank somaticcell count on US dairies. J Am Vet Med Assoc. 2005; 226(10):1652-8.

15- Mohammad Sadegh M, Askari Badouei M, Gorjidooz M, Daneshvar M, Koochakzadeh A. A Study on the clinical Coliform mastitis of Holstein cows on Garmsar suburban dairy farms. J Vet Microbiol. 2012; 8(2):137-49. [In Persian].

16- Schukken YH, Barkema HW, Lam TJ, Zadoks RN. Improving udder health on well managed farms: mitigating the perfect storm. In: International Conference on the Mastitis Control from Science to Practice. The Haque 2008; 10(2):21-35.

17- Bradley AJ, Green MJ. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. J Dairy Sci. 2000; 83(9):1957-65.

18- Shpigel NY, Chen R, Winkler M, Saran A, Ziv G, Longo F. Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. Res Vet Sci. 1994; 56(1):62-8.

19- Hassani Tabatabaie AM, Firouzi R. Animal diseases due to bacteria. 3nd ed. Tehran: Tehran University; 2016. P. [In Persian].

20- Paulin-Curlee GG, Singer RS, Sreevatsan S, Isaacson R, Reneau J, Foster D, *et al*. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumonia*e in dairy cows. J Dairy Sci. 2007; 90(8):3681-9.

21- Osman KM, Hassan HM, Orabi A, Abdelhafez AS. Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumonia*eisolated from buffalo and cow mastitic milk. Pathog Glob Health. 2014; 108(4):191-9.

22- Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumonia*e using capsular type-specific, variable-number tandem repeat and virulence gene targets. J Med Microbiol. 2010; 59(Pt 5):541-7.

23- Tavakol M, Momtaz H. Molecular characterization of serotypes and capsular virulence genes in cps gen group of *Klebsiella pneumonia* isolated from Tehran hospitals. J Microbiol World. 2017; 10(1):17-25. [In Persian].

24- Kanevsky-Mullarky I, Nedrow AJ, Garst S, Wark W, Dickenson M, Petersson-Wolfe CS, *et al.* Comparison of virulencefactors in *Klebsiella pneumonia*e strainsassociated with multiple or single cases of mastitis. J Dairy Sci. 2014; 97(4):2213-8.

Detection of virulence factors in *Klebsiella pneumonia* strains isolates from bovine mastitis

Sepideh Karimi[1], Hassan Momtaz*[2]

1- Post graduated of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2- Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: June 23, 2018; Revise: July 16, 2018; Accept: September 11, 2018

Summary

Bovine mastitis is one of the epidemic diseases in dairy cattle that is created by various infectious agents. The aim of this study was tracking of these bacteria in the cases such as bovine subclinical and clinical mastitis and studying of virulence factors of these bacteria. Overall, 130milk samples were collected from dairy cattle's in the Chaharmahal and Bakhtiyari Province. The samples were affected with mastitis and were isolated and went through microbial culture and molecular confirmation of Klebsiella pneumonia strains. Finally, presence of the most prevalent virulence factors in these strains was detected by PCR method. Of the 130milk samples examined, 30 samples were positive (15.38%) to Klebsiella pneumonia. Of these strains, most of the virulence factors were detected in these bacteria, so that fimH and papA genes by excess of 65and 90% had the highest prevalence and sfa/focDE gene with 15% presence had the lowest rate of virulence gene in these isolates. Presence of all kinds of virulence factors in the Klebsiella pneumonia isolates indicated direct intervention of these factors in pathogenicity of bacteria. In order to detect Klebsiella pneumonia pathogen, we must study the presence distribution of virulence factors.

Keywords: *Bovine mastitis, Chaharmahal and Bakhtiyari, Klebsiella pneumonia, Virulence factors*