شناسایی و تایپینگ *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از موارد ورم پستان بالینی گاوی در شهرستان سنندج بر اساس آنالیز PCR-RFLP ژن *aroA*

سعید خانی[۱]، الهام احمدی*[۲]

۱- دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران

دریافت مقاله: ۲۴ آذر ۱۳۹۶، بازنگری: ۱۴ دی ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۱۲ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم پستان عفونی در دام‌های اهلی است. به دلیل وجود سویه‌های متعدد *استافیلوکوکوس اورئوس* و تفاوت‌های سویه‌ای در بازآرایی آلل‌های کروموزمی، روش‌های ژنوتایپینگ متفاوتی همچون آنالیز DNA کروموزمی توسط هضم آنزیمی به منظور تایپینگ ژنتیکی باکتری معرفی شده‌اند. در بررسی حاضر، برای اولین بار تنوع ژنتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان بالینی گاوی در شهرستان سنندج بر اساس آنالیز PCR-RFLP ژن *aroA* ارزیابی گردید. در این تحقیق تعداد ۱۲۰ نمونه شیر ورم پستان گاوی به روش استریل جمع‌آوری و بررسی گردید. *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده به روش کشت و آزمایشات روتین باکتریولوژیکی، با روش PCR مبتنی بر ژن *aroA* آنالیز شد. قطعه حاصل از تکثیر با اندازه ۱۱۵۳ جفت باز توسط آنزیم تعیین حدودی *TaqI* هضم و قطعات ایجاد شده الکتروفورز شدند. ۲۸ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در روش فنوتیپی جداسازی و قطعه مورد نظر در تمام جدایه‌ها مشاهده شد. در هضم آنزیمی، دو نوع الگوی هضم قابل نام‌گذاری براساس مطالعات قبلی ایجاد شد. ژنوتیپ B در ۲۳ مورد (۸۲ درصد) و ژنوتیپ N در پنج مورد (۱۸ درصد) شناسایی شد. نتایج نشان می‌دهند که *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد ورم پستان بالینی در سنندج دخیل بوده و علیرغم وجود ژنوتیپ‌های محدود، تنوع سویه‌ای در جدایه‌های این باکتری در منطقه وجود دارد. عدم شناسایی ژنوتیپ جهانی A و نیز ژنوتیپ اختصاصی باکتری در سنندج، برای اولین بار گزارش می‌شود.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، سنندج، ورم پستان گاوی، aroA ، PCR-RFLP*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: elham.ahmadi.vet@gmail.com

مقدمه

ورم پستان گاو در سرتاسر جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گاوهای شیری قلمداد می‌گردد که به دلیل کاهش مقدار تولید شیر و نیز افت کیفیت آن و همچنین تهدید سلامت دام و انسان باعث ایجاد خسارت اقتصادی گسترده می‌شود. اگرچه باکتری‌های فراوانی می‌توانند باعث ایجاد این بیماری شوند، *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از شایع‌ترین عوامل عفونی ورم پستان است که پس از سازگار شدن با بافت غده، به سرعت تکثیر یافته و به دلیل ایجاد واکنش‌های التهابی به آسیب بافتی منجر می‌شود (۱). شیوع بیماری در یک گله اغلب توسط یک سویه باکتری ایجاد و به شیوع بعدی بیماری در بین همان گونه دامی و در همان منطقه می‌انجامد.

در این شرایط جداسازی و شناسایی سویه درگیر به منظور شروع درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب، از ضرورت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. اگرچه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سخت رشد نبوده و به راحتی قابل کشت و جداسازی است، با این وجود به دلیل وجود سویه‌های متعدد باکتری و تفاوت‌های سویه‌ای در بازآرایی آلل‌های کروموزومی و محتوای عوامل ژنتیکی کمکی متغیر، روش‌های سریع و اختصاصی مبتنی بر DNA توسعه یافته‌اند (۲). در سال‌های اخیر آنالیز چندشکلی طولی قطعات برشی (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) ژنوم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* متعاقب تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) به‌طور موفقیت‌آمیزی برای شناسایی و تایپینگ باکتری معرفی شده‌اند (۲، ۳).

ژن *aroA* در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مسئول سنتز آنزیم ۵- انول پیرووبل شیکیمات ۳- فسفات سنتاز (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate: EPSP synthase) به عنوان ششمین آنزیم کلیدی در چرخه هفت مرحله‌ای سنتز اسید آمینه‌های آروماتیک (شیکیمات) است. این آنزیم با کاتالیز نمودن فسفوانول پیروات (phosphoenolpyruvate: PEP) و شیکیمات-۳- فسفات (shikimate-3-phosphate: S3P) آنرا به ۵- انول پیرووبل شیکیمات ۳- فسفات (۵- enolpyruvylshikimate 3-phosphate: EPSP) و فسفات غیرآلی تبدیل می‌کند. دو نوع آنزیم EPSPS با تشابه اسید آمینه‌ای کمتر از ۵۰ درصد شناسایی شده است. کلاس I به طور طبیعی نسبت به آنزیم گلیفوزات (glyphosate) که معمولاً در گیاهان و باکتری‌ها قابل شناسایی است حساس می‌باشد. برعکس، آنزیم EPSPS کلاس II دارای تحمل طبیعی نسبت به گلیفوزات بوده و میل پیوندی بالایی برای PEP دارا است (۴). به دلیل وجود موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن *aroA*، جایگاه شکست آن در سویه‌های مختلف باکتری برای آنزیم آندونوکلئاز تعیین حدودی *TaqI* متفاوت است و در نتیجه الگوهای حاصل از هضم آنزیمی ژن می‌تواند به عنوان ابزاری بسیار مناسب جهت ژنوتایپینگ این باکتری باشد. از سوی دیگر تایپینگ مولکولی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند در توسعه برنامه‌های کنترلی جامع ورم پستان، ردیابی منبع عفونت و نیز راه‌های انتشار آن حائز اهمیت باشد (۵). این روش برای اولین بار توسط Marcos و همکاران (۵) به منظور شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد استفاده قرار گرفت. براساس تحقیق آنها نشان داده شد که می‌توان از روش تکثیر ژن *aroA* به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای تشخیص این باکتری بهره جست. همچنین El-Huneidi و همکاران در کشور عمان (۶) و دستمالچی و همکاران در شمال غرب ایران (۷) از روش تکثیر ژن *aroA* به منظور ژنوتایپینگ

جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از موارد ورم پستان گاوی استفاده نمودند. طالبی ساعتلو و همکاران (۸) تکثیر ژن *aroA* را به منظور تایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های پوست و دستگاه ادراری انسان مورد استفاده قرار داده‌اند. با توجه به عدم وجود اطلاعات در زمینه وضعیت ژنوتیپی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مسبب ورم پستان در شهرستان سنندج، در این مطالعه از تایپینگ ژن *aroA* به منظور تفریق سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان گاوی در گله‌های سطح شهرستان استفاده گردیده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری، جداسازی و شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس: در این تحقیق مشاهده‌ای-مقطعی تعداد ۱۲۰ نمونه شیر ورم پستانی در بازه زمانی شش ماهه، از دی ماه ۱۳۹۵ تا خرداد ۱۳۹۶ از گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان بالینی حاد در اواسط دوره شیرواری و در شهرستان سنندج جمع‌آوری و شماره‌گذاری گردید. انتخاب دام‌ها براساس وجود ورم پستان بالینی به دنبال مشاهده و لمس غدد پستان، وجود لخته خون و یا چرک در شیر و نیز علائم التهابی در کارتیه‌ها بود. جدول ۱ توزیع فراوانی نمونه‌های شیر ورم پستانی اخذ شده را نشان می‌دهد. قبل از نمونه‌گیری انتهای کاریته‌ها با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد استریل و چند قطره‌ی اول دور ریخته شد و سپس از هر کاریته حدود ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر در ظروف نمونه‌گیری استریل ریخته و پس از مخلوط کردن، به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج منتقل و در کوتاه‌ترین زمان ممکن کشت شدند. روش نمونه‌گیری براساس روش نمونه‌گیری استاندارد (۹) می‌باشد.

جدول ۱- توزیع فراوانی نمونه‌های شیر ورم پستانی اخذ شده در شهرستان سنندج

تعداد زایش	گاوداری صنعتی	گاوداری نیمه صنعتی
یک شکم	۱۱	۹
دو شکم	۱۴	۱۵
سه شکم	۱۳	۱۳
چهار شکم و بیشتر	۲۲	۲۳
مجموع	۶۰	۶۰

به منظور جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه شیر روی محیط برد پارکر آگار (مرک، آلمان) کشت گردید. پلیت‌ها به مدت ۳۶-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پرگنه‌های خاکستری - سیاه رنگ احاطه شده با هاله شفاف به عنوان پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شدند. رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز بر روی تک‌کلنی‌های رشد یافته انجام گرفت. جدایه‌های کوکسی گرم مثبت و کاتالاز مثبت به محیط مانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند (۱۰). کلنی‌های زرد رنگ رشد یافته بر روی محیط مانیتول سالت آگار به عنوان نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در محیط تریپتیک سویا براث (مرک، آلمان) حاوی گلیسرول و در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آنالیز مولکولی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس: به منظور استخراج ژنوم باکتری برای استفاده در آزمایشات مولکولی، از کیت استخراج DNA ژنومی باکتری‌های گرم مثبت شرکت سیناژن (تهران، ایران) و براساس پروتکل شرکت سازنده استفاده شد.

آزمون PCR برای تأیید تشخیص باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* براساس تکثیر ژن *aroA* و با استفاده از جفت پرایمر با توالی Forward primer: 5′-AAG GGC GAA ATA GAA GTG CCG GGC-3′ متناظر با نوکلئوتیدهای ۶۳-۴۰ و Reverse primer: 5′-CAC AAG CAA CTG CAA GCA T -3′متناظر با نوکلئوتیدهای ۱۱۹۲-۱۱۷۴ انجام شد (۵). سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) و واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر(BioRad, T100 (USA صورت گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط مادر X۲ (سیناژن، ایران)، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای آغازگر، دو میکرولیتر DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ نانوگرم و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه دوبار تقطیر آماده شد. چرخه دمایی واکنش تکثیر ژن*aroA* شامل مراحل دناتوریزاسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه، ۴۰ سیکل تکرار مراحل دناتوریزاسیون در ۹۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک و نیم دقیقه، و مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود (۵). الکتروفورز محصول حاصل از تکثیر بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با SYBRSafe (اینویتروژن، آلمان) و در حضور ۱۰۰ bp plus DNA ladder (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. کنترل مثبت مورد استفاده، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سویه استاندارد ATCC 29213 و کنترل منفی مخلوط مادر فاقد DNA است.

به منظور هضم آنزیمی محصول حاصل از تکثیر ژن *aroA*، براساس پروتکل شرکت سازنده، مقدار ۱۰ میکرولیتر محصول PCR با مقدار یک میکرولیتر آنزیم*TaqI* Fast digest (سیناژن، ایران) مجاور و به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از پایان مدت زمان انکوباسیون، محصول هضم شده مجددا بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با SYBR Safe در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. در این مرحله از loading dye اختصاصی همراه آنزیم (سیناژن، ایران) به منظور الکتروفورز محصولات هضم‌شده استفاده شد، به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از محصول با ۱ میکرولیتر ازloading dye مخلوط و به هر چاهک منتقل گردید. در الگوی هضم A، پنج باند با اندازه ۵۳۶، ۲۵۴، ۲۴۴، ۸۲ و ۳۲ جفت بازی، در الگوی هضم B، چهار قطعه ۵۳۶، ۳۴۱، ۲۴۴ و ۳۲ جفت بازی، در الگوی هضم C، چهار قطعه ۵۳۶، ۴۹۹، ۸۷ و ۳۲ جفت بازی و در الگوی D، پنج باند ۳۰۰، ۳۴۱، ۲۴۴، ۲۲۰ و ۵۰ جفت بازی ایجاد می‌گردد (۵). الگوی N دارای پنج قطعه ۲۹۷، ۲۵۹، ۲۵۴، ۲۴۴ و ۸۷ جفت بازی است که چون سه قطعه ۲۵۹، ۲۵۴ و ۲۴۴ جفت بازی به صورت یک باند ظاهر می‌شوند ، لذا در نهایت سه باند مشخص در الگوی N به دست می‌آید (۶). در الگوی H که متشکل از چهار قطعه ۵۶۸، ۲۵۴، ۲۴۴ و ۸۷ جفت بازی است، از آن جائی که قطعات ۲۵۴ و ۲۴۴ جفت بازی، به صورت یک باند واحد ظاهر می‌شوند، لذا در مجموع سه باند مشخص مشاهده می‌گردد (۷).

آنالیز آماری داده‌ها: در نهایت، برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین متغیرهای تعداد زایش و نوع گاوداری با میزان شیوع ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* و نیز الگوهای RFLP به دست آمده، از نرم افزار SPSS (version 21.0) و آزمون کای اسکوئر استفاده گردید. سطح معنی‌داری به صورت $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج جداسازی و شناسایی باکتری

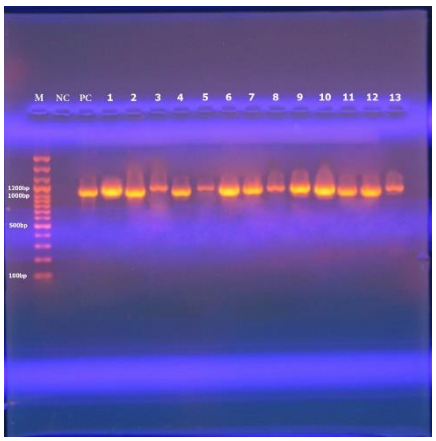
استافیلوکوکوس اورئوس: به دنبال کشت نمونه‌های شیر ورم پستانی جمع‌آوری شده از دامداری‌های صنعتی شهرستان سنندج، از مجموع ۱۲۰ نمونه شیر آلوده، تعداد ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با توجه به خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی آنها جداسازی شد. توزیع فراوانی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با توجه به متغیرهای تعداد زایش و نوع گاوداری صنعتی و نیمه‌صنعتی در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- توزیع فراوانی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر ورم پستانی در شهرستان سنندج

تعداد زایش	گاوداری صنعتی	گاوداری نیمه‌صنعتی
یک شکم	۲	۱
دو شکم	۱	۲
سه شکم	۲	۵
چهار شکم و بیشتر	۶	۹
مجموع	۱۱	۱۷

نتایج آنالیز مولکولی جدایه‌های

استافیلوکوکوس اورئوس: در تکثیر PCR ژن *aroA* با استفاده از جفت پرایمرهای مذکور و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، باند ۱۱۵۳ جفت بازی مورد انتظار در تمام ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید (تصویر ۱).

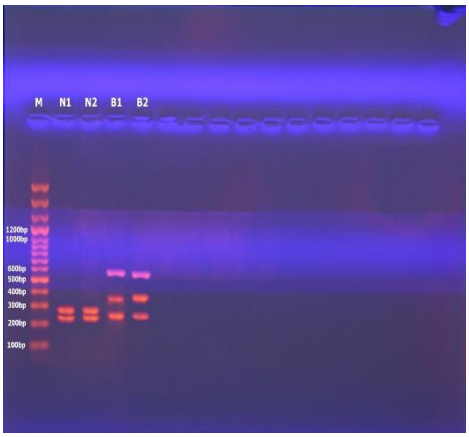


تصویر ۱- تصویر الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *aroA*. **M: 100bp plus DNA ladder** (سیناژن، ایران)، **NC**: کنترل منفی، **PC**: کنترل مثبت، ۱۳-۱: محصول **PCR** با اندازه تقریبی ۱۱۵۳ جفت باز در نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از شیر ورم پستانی

در هضم آنزیمی محصول ۱۱۵۳ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *aroA* توسط آنزیم اندونوکلئاز *TaqI*، دو الگوی هضم RFLP مجزا در مجموع ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمد که براساس سیستم ژنوتایپینگ Marcos و همکاران (۵) و El-Huneidi و همکاران (۶) مشخص گردید که ۸۲ درصد جدایه‌ها (۲۳ نمونه) دارای ژنوتیپ B و ۱۸ درصد جدایه‌ها (پنج نمونه) دارای

ژنوتیپ N بودند (تصویر ۲). توزیع فراوانی الگوهای RFLP حاصل از هضم آنزیمی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط آنزیم *TaqI* با توجه به متغیرهای تعداد زایش و نوع گاوداری صنعتی و نیمه‌صنعتی در جدول ۳ نشان داده شده است.

آنالیز آماری داده‌ها: در بررسی آماری نتایج به دست آمده توسط آزمون کای اسکوئر مشخص گردید که با توجه به مقدار P بزرگتر از ۰/۰۵، بین میزان فراوانی ورم پستان ناشی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با نوع گاوداری (P=0.074) و همچنین بین میزان شیوع این نوع ورم پستان با تعداد زایش در دام (P=0.614) اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد. به علاوه، بین توزیع فراوانی الگوهای RFLP حاصل از هضم آنزیمی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر ورم پستانی با نوع گاوداری اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده نگردید (P=0.087)، در حالی‌که این اختلاف بین الگوهای RFLP و تعداد زایش معنی‌دار بود (P=0.032).



تصویر ۲- محصول هضم آنزیمی حاصل از تکثیر ژن *aroA* توسط آنزیم اندونوکلئاز *TaqI*. M: نردبان ژنتیکی ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن، ایران)، N1 و N2: الگوی هضم آنزیمی N، B1 و B2: الگوی هضم آنزیمی B.

جدول ۳- توزیع فراوانی الگوهای RFLP حاصل از هضم آنزیمی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از نمونه‌های شیر ورم پستانی در شهرستان سنندج

تعداد زایش	گاوداری صنعتی	گاوداری نیمه صنعتی
یک شکم	N=۱ B=۱	N=۱
دو شکم	N=۱	N=۲
سه شکم	B=۲	B=۵
چهار شکم و بیشتر	B=۶	B=۹
مجموع	N=۲ B=۹	N=۳ B=۱۴

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان یکی از متداول‌ترین عوامل عفونی ایجاد کننده عفونت‌های بافت پستان در دام‌های اهلی بوده و باعث بروز خسارت اقتصادی گسترده در صنعت دامپروری می‌گردد. این باکتری بر روی پوست سرپستانک و یا در داخل کانال پستانی وجود داشته و در صورت ایجاد شرایط مساعد باعث بروز بیماری ورم پستان با منشأ درون‌زاد می‌گردد. همچنین از طریق دستگاه شیردوشی، فومیت‌ها، حوله مورد

استفاده برای خشک کردن سرپستانک‌ها، دست شیردوش و غیره از دام مبتلا به دام‌های سالم منتقل و باعث اشاعه بیماری در گله با منشأ برون‌زاد می‌شود (۱۱). هدف از تحقیق حاضر ژنوتایپینگ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان بالینی گاوی در شهرستان سنندج براساس الگوهای هضم ژن *aroA* بود.

نتایج برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که ورم پستان گاوی تنها توسط سویه‌های خاص و محدودی با پراکندگی جهانی ایجاد می‌شوند (۱۲، ۲)، در حالی که برخی دیگر از مطالعات نشان می‌دهد که سویه‌های ایجاد کننده ورم پستان عمدتاً دارای محدودیت به هر منطقه و حتی گله خاص هستند (۱۳). سیستم تایپینگ براساس محصول PCR، همچون آنالیز PCR-RLFP ژن*aroA* به دلیل سادگی و سرعت انجام می‌تواند به عنوان یکی از مؤثرترین روش‌ها برای شناسایی و ژنوتایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد (۵).

در این مطالعه از مجموع ۱۲۰ نمونه ورم پستان جمع‌آوری شده از موارد ورم پستان گاوی از گاوداری‌های صنعتی شهرستان سنندج، تعداد ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش فنوتیپی شناسایی و براساس روش مولکولی تکثیر ژن *aroA* مورد تأیید قرار گرفت به گونه‌ای که قطعه ۱۱۵۳ جفت بازی مورد انتظار در تمام جدایه‌ها به‌دست آمد.

به دنبال هضم آنزیمی محصولات حاصل از تکثیر ژن*aroA* توسط آنزیم *TaqI* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با منشأ شیر ورم پستانی گاو و گوسفند در شمال غرب اسپانیا توسط Marcos و همکاران چهار الگوی هضم A، B، C و D به‌دست آمد (۵). در مطالعه El-Huneidi و همکاران بر روی ژنوتایپینگ باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم پستان گاوی در عمان براساس سیستم ژنوتایپینگ Marcos و همکاران (۱۹۹۹) فقط الگوهای A و B مشاهده و ژنوتیپ‌های C و D در هیچ یک از جدایه‌های مورد مطالعه مشاهده نشدند (۶). با این وجود ۵۰ درصد جدایه‌های مورد مطالعه آنها از سیستم ژنوتایپینگ Marcos و همکاران (۵) تبعیت نکرده و به دنبال هضم آنزیمی محصول تکثیر ژن *aroA* توسط آنزیم *TaqI* الگوی جدیدی به عنوان N (از کلمه novel به معنی جدید گرفته شده است) مشاهده شد (۶). در مطالعات دستمالچی و همکاران (۷) به منظور ژنوتایپینگ جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان گاوی در شمال غرب ایران علاوه بر الگوهای A و B براساس سیستم Marcos و همکاران (۵) و الگوی N براساس سیستم El-Huneidi و همکاران (۶)، الگوی جدیدی به نام H مشاهده گردید. در مطالعه طالبی ساعتلو و همکاران (۸) نیز الگوهای A و B براساس سیستم Marcos و همکاران (۵) و الگوی N براساس سیستم El-Huneidi و همکاران (۶) و الگویH براساس سیستم دستمالچی و همکاران (۷) به دست آمد. در تحقیق حاضر، به دنبال تکثیر ژن *aroA* باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان گاو و استفاده از آنزیم تعیین حدودی *TaqI*، براساس سیستم‌های معرفی شده مورد اشاره، الگوهای B و N مشاهده گردید. مطالعات Marcos و همکاران نشان داد که ۳۹ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* متعلق به تیپ A، ۱۳ درصد متعلق به تیپ B، ۳ درصد متعلق به تیپ C و ۴۴ درصد متعلق به تیپ D بودند (۵). در مطالعات El-Huneidi و همکاران، ۳۹ درصد جدایه‌ها دارای ژنوتیپ A، ۱۱ درصد جدایه‌ها دارای ژنوتیپ B و ۵۰ درصد جدایه‌ها دارای ژنوتیپ N بودند (۶). در مطالعات دستمالچی و همکاران (۷) ژنوتیپ‌هایA و B در مجموع دارای بیشترین

فراوانی با۴۱ درصد در مورد ژنوتیپ Aو ۵۰ درصد در مورد ژنوتیپ B بودند. در ۷ درصد جدایه‌ها ژنوتیپ H و در ۲ درصد جدایه‌ها ژنوتیپ N مشاهده گردید. طالبی ساعتلو و همکاران (۸) نشان دادند که در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری و پوست در انسان، تیپ N دارای بیشترین فراوانی (۸۱ درصد) بوده و پس از آن تیپ‌های B (۸ درصد) و H (۸ درصد) و تیپ A (۴ درصد) قرار دارند. در این مطالعه در مجموع ۲۸ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از موارد ورم پستان بالینی گاوی تیپ B در ۲۳ مورد (۸۲ درصد) و تیپ N در پنج مورد (۱۸ درصد) مشاهده گردید. ژنوتیپ‌های C، D، A وH در هیچ‌کدام از جدایه‌ها وجود نداشت. مقایسه نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، تحقیقات Marcos و همکاران (۵)، El-Huneidi و همکاران (۶)، و دستمالچی و همکاران (۷) با نتایج به دست آمده از مطالعه طالبی ساعتلو و همکاران (۸) نشان می‌دهند که احتمال فراوانی ژنوتیپ‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد کننده عفونت‌های بافت پستان گاو در مناطق مورد مطالعه با فراوانی ژنوتیپ‌های غالب *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت‌های انسانی کاملا متفاوت است. یک احتمال برای این مسأله این است که ماهیت ژنتیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد بیماری در بافت‌ها و نیز میزبان‌های مختلف مؤثر است، به این ترتیب که ظاهراً ماهیت ژن‌های حدت بیان شده در یک سویه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور اولیه به عنوان نوعی عامل تعیین‌کننده مهم در اختصاصیت میزبان و حتی بافت مورد تهاجم عمل می‌کنند (۱۴). همچنین آنالیز ژنتیک جمعیت نیز شواهد قوی از اختصاصیت میزبانی کلون‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* درگیر در موارد عفونت‌های استافیلوکوکوسی انسان و نشخوارکنندگان را نشان می‌دهند (۱۵). اگرچه بررسی اختلاف آماری معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ‌ها با تعداد زایش در دام در هیچ مطالعه‌ی دیگری انجام نگرفته است، با این وجود در تحقیق حاضر فراوانی ژنوتیپ N محدود به دام‌های با تعداد زایش یک یا دو و فراوانی ژنوتیپ B به‌طور غالب در دام‌های با تعداد زایش بیش از دو شکم مشاهده گردید. این یافته تا حدودی نشان می‌دهد که علاوه بر ژنتیک و فاکتورهای حدت باکتری، شرایط میزبان نیز در کلونیزه شدن و ایجاد بیماری توسط این جرم مؤثر است.

اگرچه نتایج به دست آمده از این تحقیق محدود به منطقه‌ی جغرافیایی خاصی است، با این وجود، یافته‌های سایر محققین را تأیید می‌کند که تنها ژنوتیپ‌های محدودی از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد ورم پستان بالینی گاو درگیر می‌باشند (۱۶). از سوی دیگر، نتایج سایر مطالعات نشان می‌دهند که ژنوتیپ‌های H وN به ندرت از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در موارد ورم پستان گاوی جدا می‌گردند و ژنوتیپ‌های A و B دارای بیشترین فراوانی هستند. نکته جالب اینکه برخلاف سایر مطالعات، ژنوتیپ A در بین هیچ یک از جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مولد ورم پستان گاوی در منطقه سنندج یافت نگردید. اگرچه براساس نتایج سایر محققین این ژنوتیپ در همراهی با ژنوتیپ B، بیشترین عادت یافتگی به بافت پستان گاو را دارد، اما به دلیل وجود تفاوت در تغییرات ژنتیکی ناشی از جهش‌های نقطه‌ای در ژن *aroA* در هر منطقه نسبت به مناطق دیگر (۱۴)، ژنوتیپ A در این مطالعه یافت نشد. با این وجود در مجموع نمی‌توان این نکته را نادیده گرفت که پراکندگی وسیع جغرافیایی در مورد این ژنوتیپ‌ها وجود دارد.

نتیجه‌گیری کلی این‌که ژنوتیپ‌های B و N در ژن *aroA* جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

ایجادکننده ورم پستان در گاو در شهرستان سنندج شناسایی شد. وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین شیوع ژنوتیپ‌ها با تعداد زایش در دام، بیانگر نقش احتمالی شرایط فیزیولوژیکی دام در روند بیماری‌زایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در موارد ورم پستان بالینی است. وجود تنوع ژنتیکی محدودتر به دلیل عدم شناسایی ژنوتیپ‌های A و H گزارش شده از سایر تحقیقات و نیز ژنوتیپ اختصاصی منطقه، برای اولین بار در این مطالعه مشاهده گردید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاران محترم در آزمایشگاه میکروبیولوژی و تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج قدردانی می‌شود. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی به شماره ثبت ۹۴/۱۲۹۰ر-د-د می‌باشد. همچنین بین نویسندگان و نیز با هیچ مؤسسه یا ارگان دولتی و خصوصی تعارض منافع وجود ندارد.

References

1- Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goat sand sheep. Vet Microbiol. 2004; 101(1):101-107.

2- El-Seedy FR, El-Shabrawy M, Hakim AS, Dorgham SM, Ata SN, Bakry MA, *et al.* Recent techniques used for isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from mastitic cows. J Am Sci 2010; 6(12):701-708.

3- Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J Dairy Sci. 2005; 88:3149-3154.

4- Cascon AS, Anguita JC, Hernanz CM, Sa´nchez MS, Yugueros JM, Naharro GC. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol Lett. 1997; 156:199-204.

5- Marcos JY, Soriano AC, Sa´nchez MS, Moral CH, Ramos SS, Smeltzer MS, *et al.* Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. J Clin Microbiol. 1999; 37:570-574.

6- EL-Huneidi W, Bdour S, Mauasnen A. Detection of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* and of a novel *aroA* in Jordanian clinical isolates of *staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006; 56:127-132.

7- Dastmalchi HS, Ahmadi M, Mardani K, Batavani RA. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on PCR-RFLP analysis of the *aroA* gene. Comp Clin Path. 2010; 19:163-168.

8- Talebi-Satlou R, Ahmadi M, Ghavam F, Dastmalchi HS. Use of 5- enolpyruvylshikmate-3phosphate synthase encoding gene for typing of *Staphylococcus aureus* isolated from skin and urinary tract Infections of human. Iran J Basic Med Sci. 2012; 15:975-982.

9- Hope AF. Laboratory handbook on bovine mastitis. 1st ed. Madison, Wisconsin: National Mastitis Council (NMC); 1999. p. 113-123.

10- Quinn PJ, Markey Bk, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maguire D. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 1st Ed. New York: Blackwell Science; 2002. p. 315-328.

11- Bhati T, Nathawat P, Sharma SK, Yadav R, Bishnoi J, Kataria AK. Polymorphism in *spa* gene of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis. Vet World. 2016; 9(4):421-424.

12- Bendahou A, Lebbadi M, Ennanei L, Essadqui F, Abid M. Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products in North Morocco. J Infect Dev Ctries. 2008; 2:218-225.

13- Sasidharan S, Prema B, Yoga LL. Antimicrobial drug resistance of *Staphylococcus aureus* in dairy products. Asian Pac J Trop Biomed. 2011; 1(2):130-132.

14- Van Leeuwen WB, Melles DC, Alaidan A, Al-Ahdal M, Boelens HAM, Snijders SV, *et al.* Host and tissue-specific pathogenic traits of *staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2005; 187:4584-4591.

15- De Oliveira LP, Soares e Barros LS, Silva VC, Cirqueira MG. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. Journal of Food Processing and Technology. 2011; 2(6):128-132.

16- Huijps K, Lam TJ, Hogeveen H. Costs of mastitis: facts and perception. J Dairy Res. 2008; 75:113-120.

Identification and Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Bovine Mastitis in Sanandaj City Using PCR-RFLP Analysis of the *aroA* Gene

Saeid Khani [1], Elham Ahmadi *[2]

1 - Undergraduate Student of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj
2 - Department of Veterinary Pathobiology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj

Receive: December 15, 2017; Revise: January 4, 2018; Accept: March 3, 2018

Summary

Staphylococcus aureus is one of the most important causes of contagious mastitis in domestic animals. Due to the existence of multiple strains of *S. aureus* and strain variations in chromosomal allelic rearrangement, different genotyping methods, such as analysis of the chromosomal DNA following the enzymatic digestion, are introduced for genetic typing of the bacterium. In the present survey, for the first time, the genetic diversity of *S. aureus* recovered from clinical bovine mastitis in Sanandaj was investigated based on PCR-RFLP analysis of the *aroA* gene. 120 bovine mastitic milk samples were collected aseptically and assessed. *S. aureus* isolated in culture and routine bacteriological methods were analyzed by *aroA* gene-based PCR. The amplicons with a size of 1153bp were digested with *Taq*I restriction enzyme and the fragments were electrophoresed. 28 *S. aureus* strains were isolated in phenotypic method among which the expected amplicon was observed in all of them. In enzymatic digestion, two RFLP patterns, nomenclatural based on the previous studies were generated. Genotype B was detected in 23 (82.14%) isolates and genotype N in 5 isolates (17.85%). The results demonstrate that *S. aureus* is involved in bovine mastitis in Sanandaj and despite the presence of limited genotypes, strain variation of this bacterium exist in the region. The presence of genotype B in all farms implies the same source of infection among farms, which should be considered in control programs of mastitis. Non-detection of universal genotype A and specific genotype of the bacterium in Sanandaj is reported for the first time.

Keywords: *aroA, Bovine mastitis, PCR-RLFP, Sanandaj, Staphylococcus aureus*