جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی ایجاد کننده ورم پستان در گاوهای شیری شهر اصفهان

سارا امیری فهلیانی[۱]، کیوان بهشتی مآل[*۲]، فرشته قندهاری[۳]

تاریخ دریافت :۱۳۹۷/۵/۶
تاریخ پذیرش : ۱۳۹۸/۳/۱۸

چکیده

ورم پستان نوعی التهاب غدد پستانی و یکی از شایع ترین بیماری های موجود در صنعت دامپروری است که از نظر بالینی و اقتصادی اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش از شیر۴۰ راس گاو موجود در گاوداری‌های شهر اصفهان نمونه برداری صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و به منظور شناسایی گونه‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های شناسایی ماکروسکوپی، میکروسکوپی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی‌های صورت گرفته، آلودگی تعداد ۳۰ نمونه از ۴۰ نمونه را به باکتری‌های Klebsiella oxytoca، Enterobacter cloacae و Kocuria marina نشان داد که بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به Klebsiella oxytoca به میزان ۵۶/۶ درصد و Kocuria marina به میزان ۲۰ درصد بود. با توجه به تعداد زیاد نمونه‌های آلوده، ورم پستان هم چنان یکی از مخرب ترین بیماری‌های صنعت دامپروری به شمار می آید.

واژه های کلیدی: ***انتروباکتر کلواکه، کلبسیلا اکسی توکا، کوکوریا مارینا، گاوهای شیری، ورم پستان***

مقدمه

صنایع لبنی یکی از مهم‌ترین صنایع در بسیاری از کشورها می‌باشد و نقش بسیار مهمی در تغذیه انسان و همچنین تولیدات دامی یک کشور ایفا می‌کند. با این حال بیماری‌های عفونی و غیرعفونی ایجاد شده در دام‌ها، یکی از چالش‌های پیش روی دامداران می باشد(Kvis, 2016, Sanotharan *et al*., 2016, El-Hamid, 2016). یکی از بیماری‌های بسیار شایع و مخرب صنعت دامپروری که علاوه بر تاثیر بر روی کیفیت و تولید شیر و همچنین سلامت انسان، می تواند منجر به از بین رفتن گاو آلوده نیز شود، بیماری ورم پستان می باشد(Shaheen *et al*., 2016, Gomes *et al*., 2016, Vliegher *et al*., 2012) . ورم پستان یک واکنش التهابی غده پستانی است که در نتیجه ورود میکروارگانیسم‌های بیماری زا به پستان و سپس تکثیر و تولید توکسین

۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
*(نویسنده مسئول beheshtimaal@iaufala.ac.ir)
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

توسط آن‌ها، بروز پیدا می‌کند (Basdew & Laing, 2011). از مهم ترین تغییراتی که سندرم ورم پستان بر روی شیر ایجاد می‌کند می توان به تغییر در رنگ و طعم شیر، ایجاد لخته، افزایش بار میکروبی، کاهش ویتامین‌های B1وB2 ،کاهش مواد معدنی (کلسیم، سدیم و فسفر)، کاهش چربی کازئین و افزایش لاکتوفرین و اسیدیته شیر شاره نمود. عوامل ایجاد کننده ورم پستان به دو گروه عوامل واگیردار (*Staphylococcus aureus* ، *Streptococcus agalactiae*، *Mycoplasma bovis*، *Corynebacterium bovis*) و محیطی (*Escherichia coli*، *Klebsiella* ، *Streptococcus uberis* و *Streptococcus disagalactiae*) تقسیم می شوند (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱; عزت پناه و همکاران، ۱۳۸۷ ; Basdew & Laing, 2011).

بر اساس وجود یا عدم وجود علائم بالینی، این بیماری به دو صورت بالینی و تحت بالینی بروز پیدا می‌کند. در فرم بالینی ورم پستان، به دلیل آشکار بودن علائم بالینی شامل ناهنجاری‌های پستان، تب و تغییر در ظاهر شیر، به راحتی توسط دامپزشک تشخیص داده می‌شوند و تحت درمان قرار می‌گیرند (Vliegher *et al*., 2012, Kulkarni & Kaliwal, 2013) اما در ورم پستان تحت بالینی که شکل مخفی و پنهان این بیماری است، به دلیل عدم وجود علائم بالینی، تشخیص بسیار دشوار می‌باشد و به همین دلیل این نوع از ورم پستان بسیار حائز اهمیت است. در این نوع ورم پستان تولید و کیفیت شیر کاهش یافته و به دلیل ظاهر سالم گاو، امکان انتقال بیماری از گاوهای آلوده به گاوهای سالم نیز وجود دارد(Sanotharan *et al*., 2016, Shaheen *et al*., 2016, Vliegher *et al*., 2012, Kulkarni & Kaliwal, 2013). امروزه به منظور درمان عفونت ورم پستان از آنتی بیوتیک‌های متعددی استفاده می‌شود. کارایی بالینی آنتی بیوتیک‌ها، بسته به نوع ورم پستان ایجاد شده، محل و وسعت عفونت، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و سنتتیک داروهای استفاده شده و الگوی حساسیت پاتوژن، تغییر می‌کند. معیارهای مهم برای شروع درمان ورم پستان شامل تشخیص نوع ورم پستان، میزان آسیب‌های پاتولوژیکی به پستان، نوع پاتوژن‌های درگیر، الگوی حساسیت دارویی و انتخاب داروی ضد میکروبی با خواص دارویی ایده‌آل می‌باشد (Shaheen *et al*., 2016, Kulkarni & Kaliwal, 2013). لذا هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی عفونت ورم پستان در گاوهای شیری به منظور پیش گیری و درمان می‌باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

در این پژوهش، برای جداسازی باکتری‌های مورد نظر از ۵ گاوداری شهر اصفهان تعداد ۴۰ نمونه شیر در تابستان ۱۳۹۵ به مدت ۵ ماه، جمع آوری و مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل ۳۰ نمونه شیر از گاوهای به ظاهر سالم و همچنین تعداد ۱۰ نمونه از گاوهای مبتلا به عفونت ورم پستان بودند. در این پژوهش علاوه بر گاوهای مبتلا به عفونت ورم پستان، از گاوهای

به ظاهر سالم هم نمونه گیری انجام گرفت زیرا بر اساس علائم مرتبط با عفونت، ورم پستان واگیردار به سه نوع بالینی ، تحت بالینی و مزمن تقسیم بندی می‌شود.

ورم پستان تحت بالینی یک فرم پنهان و مخفی این بیماری است که در آن علائم بالینی و یا سیستمیک قابل مشاهده نمی‌باشد. این فرم از عفونت ورم پستان بیش از ۴۰ برابر نوع بالینی آن، در گاوهای شیری رخ می‌دهد و موجب خسارت‌های اقتصادی بسیار زیادی به صنعت دامپروری می‌شود (Sanotharan *et al*., 2016, Shaheen *et al*., 2016, Kulkarni & Kaliwal, 2013). تشخیص این بیماری به دلیل ظاهر سالم شیر، عدم وجود لخته، تب، تورم و درد پستان بسیار دشوار است. در این نوع ورم پستان، تولید و کیفیت شیر کاهش می‌یابد و به دلیل ظاهر سالم گاو، امکان انتقال بیماری از گاوهای آلوده به گاوهای سالم وجود دارد (Sanotharan *et al*., 2016, Kulkarni & Kaliwal, 2013, Vliegher *et al*., 2012). نمونه گیری به این صورت بود که ابتدا سر پستانک گاو با پنبه آغشته به الکل ضدعفونی و سپس چند دوشش اولیه دور ریخته شد. از هر یک از گاوها مقدار ۱۰ میلی لیتر شیر در لوله‌های استریل جمع آوری و در مجاورت یخ به مرکز آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان منتقل شد (Pati & Mukherjee, 2016, Castaneda *et al*., 2013). به منظور جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های شیر مورد مطالعه، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی محیط کشت عمومی و غنی برین هارت اینفیوژن آگار کشت داده شد. سپسکشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. جهت خالص سازی نمونه‌های باکتریایی، کلنی‌های منفرد بر اساس شکل ظاهری انتخاب و هر کدام مجددا" به طور جداگانه و بر روی محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار کشت و درون انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از اطمینان از خالص بودن باکتری‌ها، شناسایی آن‌ها صورت گرفت. در روش شناسایی ماکروسکوپی، ابتدا کلنی‌های ایجاد شده بر اساس خصوصیات ظاهری همچون شکل، رنگ و اندازه مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی باکتری‌ها، رنگ آمیزی گرم صورت گرفت. با رنگ آمیزی گرم، نوع واکنش باکتری، شکل ظاهری و آرایش آن در زیر میکروسکوپ نوری قابل تشخیص می‌باشد. پس از تایید نوع واکنش گرم باکتری‌های مورد نظر، برای شناسایی بیشتر، هر کدام بر روی محیط‌هایی همچون ائوزین متیلن بلو، مک کانکی آگار و بلاد آگار کشت داده شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند (Preethirani *et al*., 2015, Hossein, 2008, Karima, 2007). در نهایت برای بررسی صفات بیوشیمیایی از تست IMViC و اوره، کاتالاز، کواگولاز، اکسیداز و تخمیر قندهایی هم چون گلوکز، لاکتوز، آرابینوز، سوکروز و گزیلوز و هم چنین تست حساسیت نووبیوسین استفاده شد (Pati & Mukherjee, 2016).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها به روش مولکولی PCR

پس از شناسایی اولیه باکتری‌ها، با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و هم چنین استفاده از دو جفت پرایمر یونیورسال RW01 و DG74 و پرایمرهای CG28F و CG43R به شناسایی نهایی و دقیق آن‌ها پرداخته شد. ابتدا با توجه به دستورالعمل کیت استخراج DNA شرکت تالی ژن پارس، DNA ژنومی استخراج و سپس تا زمان انجام تکنیک PCR در فریزر ۲۰- ذخیره شد. با استفاده از پرایمرهای یونیورسال و پرایمرهای CG28F و CG43R (جدول ۱)، روش PCR برای تکثیر قطعه 16SrDNA برای جدایه‌های مورد نظر انجام شد. تمامی شرایط انجام واکنش PCR با توجه به روش‌های پیشین انجام شد (Amiri *et al*., 2018, Khan *et al*., 2003, Riffon *et al*., 2001). در آخر محصول PCR در ولتاژ ۸۰ ولت بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ توسط نور UV مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

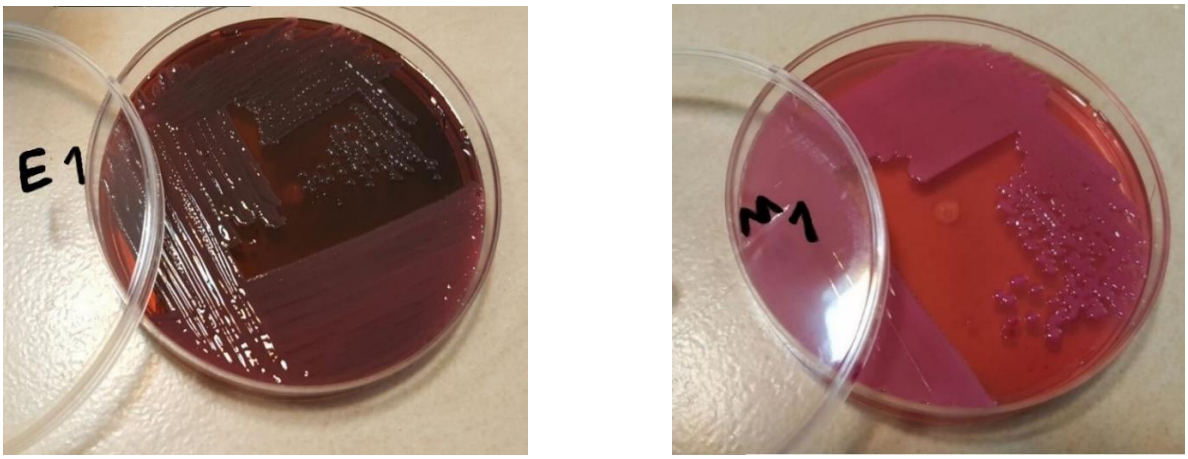
جدول ۱: توالی پرایمرهای یونیورسال برای تشخیص جدایه‌های مورد نظر در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان

مشخصات/ نام پرایمر	G+C%	نوکلئوتید	طول پرایمر	طول محصول
RW01	۵۵٪	5’AACTGGAGGAAGGTGGGGAT3’	۲۰	bp۳۷۰
DG74	۵۵٪/۹	5’AGGAGGTGATCCAACCGCA3’	۱۹	bp۳۷۰
CG28F	۵۰٪	5’TGTAAAACGACGGCCAGT3’	۱۸	bp۶۵۰
CG43R	۵۰٪	5’CAGGAAACAGCTATGACC3’	۱۸	bp۷۰۰

یافته‌ها

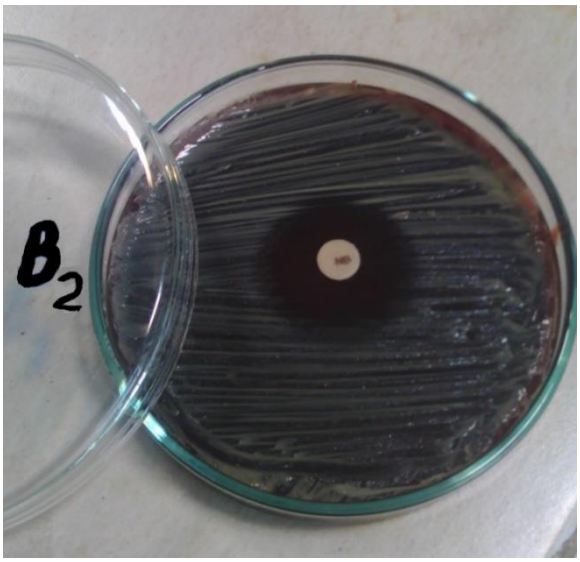
در پژوهش حاضر پس از تطبیق توالی 16S-rDNA جدایه اول با کلیه توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن از طریق نرم افزار بلاست نوکلئوتید مشخص شد که توالی مورد نظر با باکتری کلبسیلا *اکسی توکا* سویه BR-37 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: KC593550) 97 درصد پوشش و ۹۸/۷۹ درصد مشابهت و همچنین با باکتری *کلبسیلا اکسی توکا* سویه Z-30 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: GU586149) ۹۷ درصد پوشش و ۹۸/۷۹ درصد مشابهت دارد. بنابراین جدایه اول *کلبسیلا اکسی توکا* سویه ABG-IAUF-1 نامیده شد و توالی ژن 16S-rDNA آن تحت شماره دسترسی MF175803 در بانک جهانی ژن، NCBI به ثبت رسید. پس از مطابقت دادن توالی 16S-rDNA جدایه دوم با استفاده از نرم افزار بلاست نوکلئوتید با سایر توالی‌های ژنی موجود در بانک جهانی ژن مشخص شد که توالی جدایه دوم با باکتری *انتروباکترکلواکه* سویه A2014-212 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: LC089714) ۹۶ درصد پوشش و ۹۵/۷۱ درصد مشابهت و همچنین با باکتری *انتروباکترکلواکه* سویه ۱۷۴ (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: CP020528) ۹۶ درصد پوشش و ۹۵/۷۱ درصد مشابهت دارد. بنابراین جدایه دوم

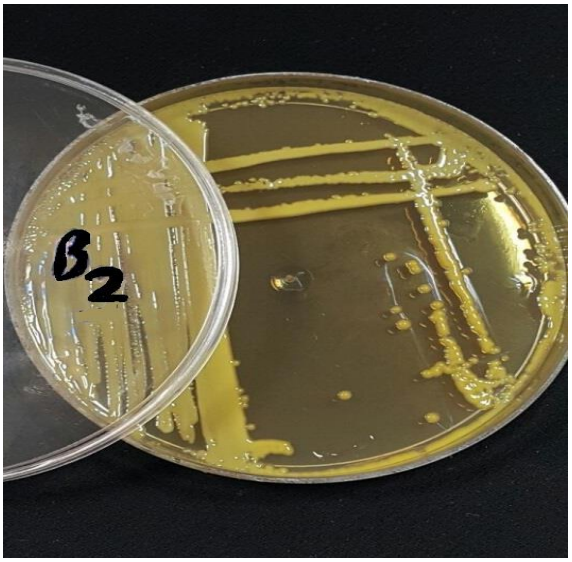
انتروباکترکلواکه سویه ABG-IAUF-2 نامیده شد و توالی ژن 16S-rDNA آن تحت شماره دسترسی MF175804 در بانک جهانی ژن، پایگاه NCBI ثبت گردید. پس از خوانش توالی‌های تکثیر شده از ژن 16S-rDNA جدایه سوم با استفاده از نرم افزار بلاست نوکلئوتید در بانک جهانی ژن مشخص شد که توالی جدایه سوم با باکتری *کوکوریا مارینا* سویه Y213 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: KF306369) ۹۸ درصد پوشش و ۹۷/۵۷ درصد مشابهت و همچنین با باکتری *کوکوریا مارینا* سویه S48 (شماره دسترسی بانک جهانی ژن: JX007973) ۹۸ درصد پوشش و ۹۷/۵۷ درصد مشابهت دارد. بنابراین جدایه سوم *کوکوریا مارینا* سویه ABG-IAUF-3 نامیده شد و توالی ژن 16S-rDNA آن تحت شماره دسترسی MF175805 در بانک جهانی ژن، پایگاه NCBI ثبت گردید. از ۴۰ نمونه مورد بررسی در این پژوهش، تعداد ۳۰ نمونه معادل ۷۵درصد آلوده به *Klebsiella oxytoca*، *Kocuria marina* و *Enterobacter cloacae* بودند. علاوه براین، در تعداد ۱۰ نمونه معادل ۲۵درصد هیچ گونه آلودگی باکتریایی مشاهده نشد (جدول ۲). طبق بررسی های صورت گرفته از ۱۷ نمونه فقط باکتری *Klebsiella oxytoca* ، از ۵ نمونه فقط *Kocuria marina* ، از ۶ نمونه فقط *Enterobacter cloacae* و از ۲ نمونه هر دو باکتری *Kocuria marina* و *Enterobacter cloacae* جداسازی و شناسایی شدند. بنابر نتایج به دست آمده میزان آلودگی باکتری‌های جداسازی شده به صورت *Klebsiella oxytoca* ۵۶/۶ درصد ، *Enterobacter cloacae* ۲۳/۳درصد ، *Kocuria marina* ۲۰ درصد گزارش گردید. بنابراین بیشترین آلودگی با ۵۶/۶ درصد مربوط به *Klebsiella oxytoca* و کمترین آلودگی با ۲۰ درصد مربوط به باکتری *Kocuria marina* بود. تصاویر مربوط به خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها در شکل۱ (۱-۱، ۱-۲، ۱-۳و ۴-۱) نشان داده شده است. علاوه براین، نتایج حاصل از مطالعات و خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و همچنین بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول ۳ و ۴ و نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در سه جدایه مورد مطالعه در شکل ۲ آورده شده است.



الف ب

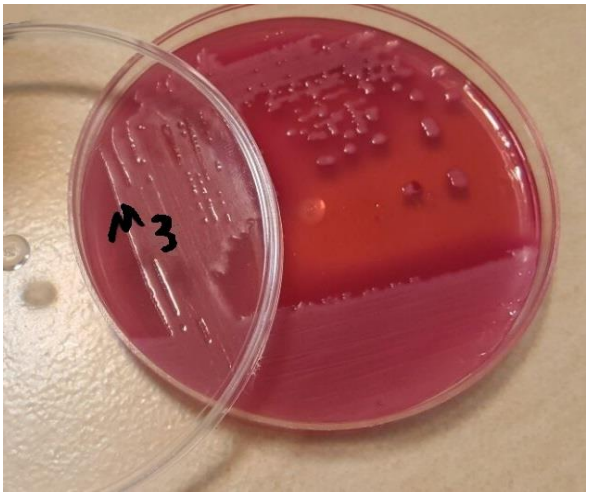
شکل ۱-۱: رشد جدایه ۱ جداسازی شده از نمونه شیر بر روی محیط کشت‌های الف) مک کانکی آگار و ب) EMB پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{o}C$

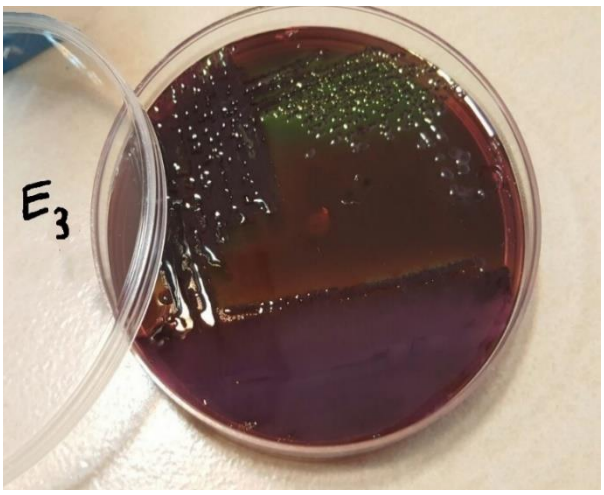




الف ب

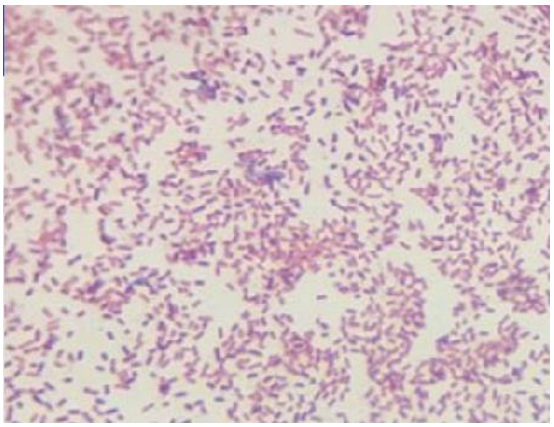
شکل ۲-۱: الف) تست حساسیت به آنتی بیوتیک نووبیوسین جدایه ۲
ب) رشد جدایه ۲ بر روی محیط کشت BHI آگار پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{o}C$



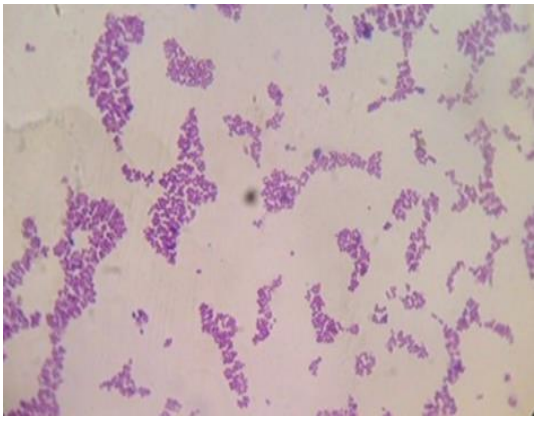


الف ب

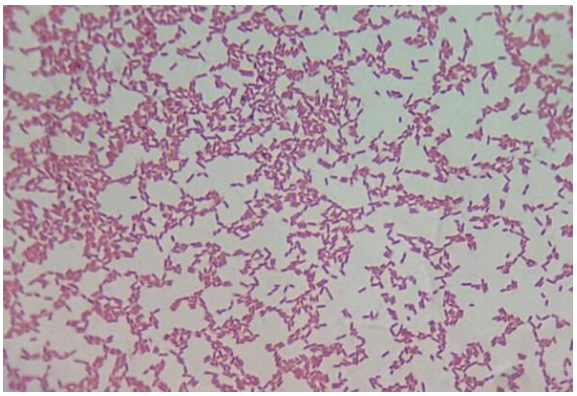
شکل ۳-۱- رشد جدایه ۳ بر روی محیط کشت‌های
الف) مک کانکی آگار و ب) EMB پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{o}C$



الف



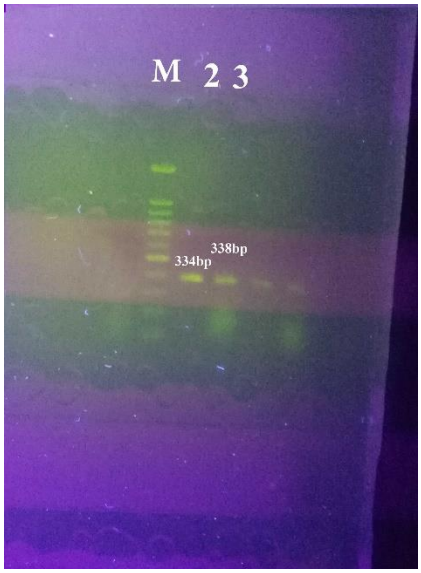
ب

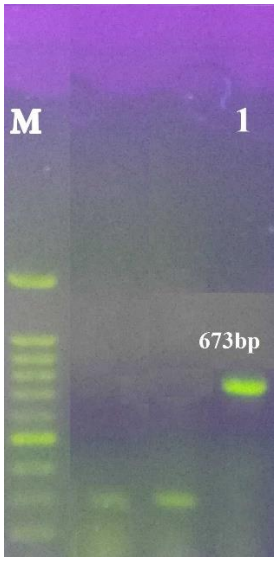


ج

شکل ۴-۱: تصویر میکروسکوپی حاصل از رنگ آمیزی گرم جدایه‌ها

الف) رنگ آمیزی گرم از جدایه ۱، ب) رنگ آمیزی گرم از جدایه ۲، ج) رنگ آمیزی گرم از جدایه ۳





ب الف

شکل ۲: نتایج حاصل از الکتروفورز قطعه 16S rDNA جدایه‌های
الف) ۱ با پرایمرهای CG43R و CG28F و ب) ۲ و ۳ با پرایمرهای عمومی RW01 و DG74 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

جدول ۲: باکتری های جداسازی شده از نمونه های شیر به تفکیک گاوداری ها

ردیف	گاوداری‌های مورد بررسی	تعداد نمونه شیر آلوده	تعداد نمونه شیر غیر آلوده	باکتری‌های جداسازی شده
۱	۱	۴	-	*Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca*
۲	۲	۸	-	*Kocuria marina, Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca*
۳	۳	۴	۲	*Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca*
۴	۴	۵	۳	*Klebsiella oxytoca, Kocuria marina*
۵	۵	۹	۵	*Enterobacter cloacae, Kocuria marina, Klebsiella oxytoca*

جدول ۳: محل نمونه برداری، خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها

جدایه	منبع جداسازی	خصوصیات ماکروسکوپی	خصوصیات میکروسکوپی
۱	نمونه شیر	کلنی های بنفش رنگ، صاف و براق، به قطر ۲-۱ میلی متر بر روی محیط EMB	کوکوباسیل گرم منفی
۲	نمونه شیر	کلنی های زرد رنگ بر روی محیط آگار خون دار و BHI آگار ، به قطر ٤-۱ میلی متر، صاف و محدب	کوکسی گرم مثبت
۳	نمونه شیر	کلنی های بنفش رنگ، به قطر ۲-۱ میلی متر، نیمه موکوئیدی، صاف و براق با جلای سبز فلزی بر روی محیط EMB	باسیل گرم منفی

جدول ۴: نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه	اندول	MR	VP	سیترات	اوره	گلوکز	لاکتوز	آرابینوز	گزیلوز	سوکروز	اکسیداز	کاتالاز	کواگولاز
۱	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
۲										+	-	+	-
۳	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+			

بحث و نتیجه گیری

شیر و فرآورده‌های حاصل از آن سرشار از مواد مغذی همچون مواد معدنی، ویتامین، پروتئین و غیره می‌باشد به همین دلیل به عنوان یکی از کامل ترین غذاها برای تمام افراد به شمار می‌آید. شیر دوشی نامناسب و تماس پستان گاو با بستر آلوده منجر به آلوده شدن بافت پستان می‌شود (Sordelli *et al*., 2000). سندرم ورم پستان یکی از عفونت‌های اندمیکی است که در پستان گاو ایجاد می‌شود و بر روی کیفیت شیر بسیار تاثیر گذار است (Basdew & Laing., 2011). سندرم ورم پستان یک نوع التهاب عفونی پستان است که علاوه بر تغییراتی که در بافت پستان ایجاد می‌کند، منجر به تغییر در طعم و مزه شیر و کاهش در تولید شیر می‌شود (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱). با وجود اقدامات کنترلی بسیاری که تاکنون صورت گرفته، متاسفانه این بیماری هنوز یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین دلایل خسارات اقتصادی در صنایع لبنی به شمار می‌آید. در این تحقیق ۷۵ درصد نمونه‌های مورد بررسی آلوده به پاتوژن‌های محیطی عفونت ورم پستان و ۲۵درصد فاقد هرگونه آلودگی باکتریایی بودند که براین اساس بیشترین آلودگی مربوط به باکتری *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و کمترین آلودگی مربوط به *Kocuria marina* با ۲۰ درصد بود. این پژوهش نشان می‌دهد فقط پاتوژن‌های محیطی از عوامل اصلی ایجاد کننده ورم پستان در واحدهای شیری اطراف اصفهان می‌باشند. در پژوهش حاضر، ۶۶/۶ درصد از گاوهای به ظاهر سالم مورد مطالعه، مبتلا به آلودگی باکتریایی بودند که نشان می‌دهد همچنان این بیماری یکی از مهم‌ترین چالش‌های موجود در دامداری‌ها است که به طور مستقیم و غیر مستقیم اقتصاد کشاورزان و در نهایت اقتصاد کشور را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین بررسی‌های دقیق تر توسط دامپزشکان و همچنین اقدامات لازم به منظور پیشگیری، کنترل و کاهش این عفونت نیز توصیه می‌شود. با توجه به داده‌های به دست آمده بین هر دو گروه مورد مطالعه یعنی گاوهای مبتلا به عفونت ورم پستان و گاوهای به ظاهر سالم از نظر تعداد و تنوع باکتری‌های جداسازی شده تفاوت معناداری وجود دارد. از ۴۰ نمونه مورد بررسی تعداد ۱۰ نمونه آلوده به عفونت ورم پستان و ۳۰ نمونه از گاوهای به ظاهر سالم بودند. از تمامی ۱۰ نمونه آلوده با فراوانی ۱۰۰ درصد باکتری‌های ایجاد کننده ماستیت جداسازی شدند. از ۳۰ نمونه فاقد علائم ، ۶۶/۶ درصد آلوده به باکتری‌های عامل ماستیت بودند و تفاوت معنادار داشتند. از بین سه باکتری جداسازی شده، دو مورد باکتری گرم منفی و تنها یک مورد باکتری گرم مثبت مشاهده شد و این بیانگر آن است که در این مطالعه بیشترین آلودگی مربوط به باکتری‌های گرم منفی بوده است. نتیجه دیگر حاصل از این پژوهش، اولین گزارش از جداسازی و شناسایی

Kocuria marina به عنوان مولد ایجاد ورم پستان در گاوهای شیری در ایران و جهان می باشد. امروزه در سراسر جهان، به دلیل اهمیت بسیار چشم گیری که این بیماری دارد مطالعات بسیار گسترده ای در این باره صورت گرفته است. El-Bagory و Zayda (۲۰۱۵) طی مطالعه ای بر روی عفونت ورم پستان، شایع ترین میکروارگانیسم‌های ایجاد کننده این نوع عفونت را به صورت *استافیلوکوکوس*های کواگولاز منفی ۳۴/۴ درصد، *Staphylococcus aureus* ۲۳/۳ درصد، *Escherichia coli* ۱۵/۲ درصد ، *Streptococcus uberis* ۹/۴ درصد ، *Streptococcus agalactiae* ۷/۴ درصد ، *Streptococcus faecalis* ۴/۲ درصد ، *Streptococcus disagalactiae* ۳/۲ درصد و *Enterobacter cloacae* ۰/۲ درصد گزارش نمودند که از هر دو نوع پاتوژن‌های محیطی و واگیردار در ورم پستان محسوب می‌شوند (El-Bagory & Zayda., 2015). در این مطالعه بیشترین آلودگی مربوط به *استافیلوکوکوس‌ها* و کمترین آلودگی مربوط به *Enterobacter cloacae* گزارش شده است. در تحقیق حاضر بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و *Kocuria marina* با ۲۰ درصد گزارش شد که نتایج تحقیق حاضر با این مطالعه مطابقت نداشت.. در سال ۲۰۱۴ Saidi و همکاران طی مطالعه بر روی عفونت ورم پستان، موفق به جداسازی ۳۵ گونه *Enterobacteriaceae* شدند که نتایج حاصل از آن به صورت *Escherichia coli* ۱۴/۳ درصد ، *Klebsiella oxytoca* ۱۴/۳ درصد ، *Enterobacter cloacae* ۱۱/۴ درصد و *Klebsiella ornithinolytica* ۱۱/۴ درصد گزارش شد (Saidi *et al*., 2014). در این مطالعه تمامی باکتری‌های جداسازی شده مربوط به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد و همچنین بیشترین آلودگی مربوط به *Escherichia coli* و *Klebsiella oxytoca* و کمترین آلودگی مربوط به *Enterobacter cloacae* و *Klebsiella ornithinolytica*گزارش شد که بر خلاف میزان شیوع هر یک از باکتری‌ها در هر دو مطالعه مورد بررسی، تحقیق حاضر با مطالعه Saidi و همکاران از نظر جداسازی و شناسایی *Klebsiella oxytoca* و *Enterobacter cloacae* مشابهت نشان داد به طوری که بیشترین آلودگی مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و کمترین آلودگی با ۲۰ درصد مربوط به *Kocuria marina* مشاهده شد. هم چنین در تحقیق حاضر علاوه بر باکتری‌های گرم منفی، باکتری گرم مثبت هم جداسازی و شناسایی شد که از این نظر با مطالعه Saidi و همکاران مطابقت نداشت. در مطالعه ای توسط Nam و همکاران در سال ۲۰۰۹، ۸۴۱ نمونه باکتری گرم منفی از عفونت ورم پستان جداسازی شد که شامل *Escherichia coli* ۱۹/۱ درصد ، *Pseudomonas fluorescens*۷درصد ، *Klebsiella pneumonia* ۶/۷ درصد ، *Enterobacter cloacae* ۶/۴ درصد ، *Acinetobacter lwoffii*۶ درصد ، *Pseudomonas aeruginosa*۵/۴ درصد ، *Serratia marcescens* ۴/۵ درصد بودند (Nam *et al*., 2009). در این مطالعه بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به *Escherichia coli* و *Serratia marcescens* بود که نتایج تحقیق حاضر با این مطالعه مطابقت نداشت به طوری که بیشترین و کمترین آلودگی به ترتیب مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد و *Kocuria marina* با ۲۰ درصد گزارش شد. بنهاسن (Benhasen) و همکاران (۲۰۰۳) ، اتیابی (Atyabi)و همکاران (۲۰۰۶) ، پیپرس (Piepers)و همکاران (۲۰۰۷) و آلمو (Almaw) و همکاران (۲۰۰۸)، استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی را به عنوان شایع ترین

باکتری‌ها در نمونه‌های شیر مورد آزمایش، گزارش نمودند (El-Bagory & Zayda., 2015). نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیق حاضر مطابقت نداشت چرا که بیشترین آلودگی در تحقیق حاضر مربوط به *Klebsiella oxytoca* با ۵۶/۶ درصد گزارش شد. در مطالعه ای که توسط Burvenich و همکاران در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت، نشان داده شده است که میزان شیوع ورم پستان ناشی از *Staphylococcus aureus* کاهش پیدا کرده است اما شیوع موارد محیطی از جمله کلی فرم‌ها و *Streptococcus uberis* در حال افزایش است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۱). با توجه به بررسی ۴۰ نمونه شیر در تحقیق حاضر و عدم جداسازی *Staphylococcus aureus* از میان عوامل ایجاد کننده ورم پستان، این احتمال وجود دارد که میزان شیوع این باکتری رو به کاهش می‌باشد و از این لحاظ تحقیق حاضر با این مطالعه مطابقت دارد. Salaki و همکاران در سال ۱۳۹۱، عوامل باکتریایی ورم پستان گاو در گاوداری‌های شهرستان ایلام را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بیشتر گاوهای مبتلا، آلوده به *Klebsiella pneumonia* و *Escherichia coli* بودند هم چنین در یکی از گاوداری‌ها، گاو ها علاوه بر این باکتری‌ها، به *Streptococcus agalactiae* نیز آلوده بودند (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱). به طور کلی در این مطالعه بیشترین آلودگی را باکتری‌های کلی فرم باعث شدند که با تحقیق حاضر مطابقت دارد چرا که در تحقیق حاضر هم بیشترین آلودگی مربوط به *Klebsiella oxytoca* (۵۶/۶٪) گزارش شد. در مطالعه ای توسط Firouzi و همکاران(۲۰۱۰) نشان داده شده که همچنان هر دو نوع پاتوژن‌های واگیردار (*Staphylococcus aureus* و *Streptococcus agalactiae*) و محیطی (*Escherichia coli*) از دام‌های مبتلا به ورم پستان در گاوداری‌های اطراف شیراز جداسازی می‌شوند (سالکی و مرادی، ۱۳۹۱). به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه با تحقیق حاضر به دلیل جداسازی هر دو نوع پاتوژن‌های واگیردار و محیطی از دام‌های مبتلا به عفونت ورم پستان در اصفهان، مطابقت نداشت. پژوهش حاضر به علت مصرف بالای فرآورده‌های لبنی توسط انسان بسیار حائز اهمیت است و همچنین باتوجه به شیوع بالای این بیماری در بین گاوهای شیرده در گاوداری‌های سراسر جهان و خسارت‌های بسیار زیادی که هم به صنعت دامپروری و هم به انسان به عنوان مصرف کننده وارد می‌شود، اهمیتی دوچندان می‌یابد. در پژوهش حاضر فقط پاتوژن‌های محیطی از نمونه‌های شیر مورد مطالعه جداسازی شدند که این امر نشان دهنده تداوم حضور پاتوژن‌های محیطی از عوامل ایجاد کننده عفونت ورم پستان و عدم درمان کامل و ریشه کن شدن آن‌ها به وسیله درمان‌های رایج از جمله آنتی بیوتیک درمانی است. به دلیل توجه بیش از حد محققان به پاتوژن‌های واگیردار ایجاد کننده ورم پستان و غافل شدن از شیوع پاتوژن‌های محیطی، در سال‌های اخیر شاهد کاهش میزان شیوع ورم پستان ناشی از پاتوژن‌های واگیردار به خصوص *Staphylococcus aureus* و متاسفانه افزایش شیوع موارد محیطی از جمله کلی فرم‌ها بوده ایم.(Burvenich *et al*., 2003). همچنین با توجه به اینکه شرایط آب و هوایی و اقلیمی هر منطقه ای متفاوت می‌باشد بنابراین نوع پاتوژن‌های جداسازی شده و همچنین میزان آلودگی آن‌ها کاملاً متفاوت است (Shaheen *et al*., 2016, Burvenich *et al*., 2003). تحقیق حاضر اولین گزارش از جداسازی *Enterobacter cloacae* به عنوان مولد ایجاد ورم پستان در ایران می‌باشد. هم چنین تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر جداسازی و

شناسایی *Kocuria marina* از نمونه‌های شیر آلوده صورت نگرفته است و این پژوهش اولین گزارش از جداسازی و شناسایی این باکتری از نمونه‌های شیر آلوده در جهان می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش و هم چنین سایر محققین حاکی از آن است که هم چنان یکی از اصلی‌ترین و مخرب‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت ورم پستان گاوهای شیری در سراسر جهان، عوامل باکتریایی می‌باشند. امید است که با نتایج حاصل از این گونه مطالعات گامی موثر در راستای پیش گیری، کاهش خسارات اقتصادی و نیز سلامت انسان برداشته شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به خاطر حمایت‌های علمی و تحقیقاتی قدردانی می‌شود.

منابع

احمدی، م، ر، حق خواه، م، روزی طلب، ج، اشراقی، ح، ر. (۱۳۹۱) مقایسه اثر درمانی پمادهای پستانی سفکوینوم (Cefquinom) و کوباکتان (Cobactan) در درمان تورم پستان بالینی گاوهای شیری. نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران، دوره ۶، شماره ۱: صفحه ۱۰-۳

سالکی، خ، مرادی، ح. (۱۳۹۱) بررسی عوامل باکتریایی ورم پستان گاو در گاوداری‌های شهرستان ایلام. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دوره بیستم، شماره ۴

عزت پناه، ح، مصلحی شاد، م، افشار، ا، وند یوسفی، ج، خدائی، م. (۱۳۸۷) تاثیر سلول‌های سوماتیک بر کیفیت شیر خام و فرآورده‌های شیری. مجله دانش و پژوهش علوم دامی، جلد ۳، صفحه ۹۸-۷۹

Amiri Fahliyani, S., Beheshti-Maal, K., Ghandehari, F. (2018) Novel lytic bacteriophages of *Klebsiella oxytoca* ABG-IAUF-1 as the potential agents for mastitis phage therapy. FEMS Microbiology Letters, 365: 1-8

Basdew, I.H and Laing, M.D. (2011) Mini-Review: Biological control of bovine mastitis using bacteriophage therapy. Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances A. Méndez-Vilas (Ed.), 1: 368-393

Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J. (2003) Severity of *E.coli* mastitis is mainly determined by cow factor. Veterinary Research, 34: 521-564

Castaneda Vazquez, H., Jager, S., Wolter, W., Zschock, M., Castaneda Vazquez, M.A., El-Sayed, A. (2013) Isolated and identification of main mastitis pathogens in Mexico. The journal Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 65: 377-382

El-Bagory, A.M and Zayda, M.G. (2015) Impact of subclinical mastitis on cow's and buffalo's milk quality. 2nd International Conference of Food Safety. Suez Canal University Faculty of Veterinary Medicine Food Hygiene Department. Agu 19 PP:64-72

El-Hamid, M.I.A. (2016) Bovine Mastitis: Current Concepts and Future Control Approaches. Austin Clinical Microbiology, 1: 1-2

Gomes, F., Saavedra, M.J., Henriques, M. (2016) Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. Pathogens and Disease, 74: 1-7

Hossein, S.A. (2008) Isolation and identification of bacterial causes of clinical mastitis in cattle in Sulaimania region. Iraqi Journal of Veterinary Science, 22: 35-41

Karima, G.A.H., Grazyna, S., Agnieszka, K.K. (2007) Public health hazard due to mastitis in dairy cows. Animal Science Papers and Reports, 25: 58-73

Khan, I.U., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Lämmler, C., Wolter, W., Zschöck, M. (2003) Identification and epidemiological characterization of Streptococcus uberis isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. Journal of Veterinary Science, 4: 213-224

Kulkarni, A.G and Kaliwal, B.B. (2013) Bovine mastitis: a review. International Journal of Recent Scientific Research, 4: 543-548

Kvist, L.J. (2016) Diagnostic methods for mastitis in cows are not appropriate for use in humans: commentary. International Breastfeeding Journal, 11: 1-3

Nam, H.M., Lim, S.K., Kang, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Jang, K.C., Kim, J.M., Joo, Y.S., Jung, S.C. (2009) prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. Journal of Dairy Science, 92: 2020-2026.

Pati, B.K and Mukherjee, R. (2016) Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates of bovine mastitis origin and antibiotic sensitivity pattern from Northern Plains of India. Journal of Veterinary Research and Animal Husbandry, 1: 1-5

Preethirani, P.L., Isloor, S., Sundareshaa, S., Nuthanalakshmi, V., Deepthikiran, K., Sinha, A.Y., Rathnamma, D., Nithin Prabhu, K., Sharada, R., Mukkur, T.K., Hegde, N.R. (2015) Isolation, biochemical and molecular identification, and in-vitro antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from Bubaline subclinical mastitis in South India. Plos One, 10: 1-15.

Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J. (2001) Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 39: 2584-2589.

Saidi, R., Khelef, D., Kaidi, R. (2014) Antibiotic susceptibility of *enterobacteriaceae* species isolated from mastitic milk in Algeria. Asian Pacific Journal of Reproduction, 3: 311-316

Sanotharan, N., Pagthinathan, M., Nafees, M.S.M. (2016) Prevalence of Bovine Subclinical Mastitis and its Association with Bacteria and Risk Factors in Milking Cows of Batticaloa District in Sri Lanka. International Journal of Scientific Research and Innovative Technology, 3: 137-150

Shaheen, M., Tantary, H.A., Nabi, S.U. (2016) A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. Journal Advances in Dairy Research, 4: 1-10

Sordelli, D.O., Buzzola, F.R., Gomez, M.I., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Catalano, M., Reitz, A.J., Tollersrud, T., Denamiel, G., Jeric, P., Lee, J.C. (2000) Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. Journal of Clinical Microbiology, 38: 846-850

Vliegher, S.D., Fox, L.K., Piepers, S., McDougall, S., Barkema, H.W. (2012) Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. Journal of Dairy Science, 95: 1025-1040

Isolation and identification of bovine mastitis bacteria in cow`s dairy in Isfahan

Sara Amiri

S.Fahliyani[1], K.Beheshti Maal[2*], F.Ghandehari[3]

Received:2018.7.27
Accepted:2019.6.8

Abstract

Mastitis syndrome is the inflammation of the mammary gland and one of the most common diseases in the livestock industries which is very important clinically and economically. In this study, 40 cows' milk were sampled at cow dairy farms in Isfahan city. The samples were transferred to the laboratory at $4^{\circ}C$ immediately. In order to identify bacterial species, samples were isolated using Brain Hart Infusion agar medium. Then the macroscopic, microscopic and biochemical characteristics were studied. Finally, the polymerase chain reaction was performed to determine the exact Spp.of isolates. This research showed that the contamination of the 30 samples out of 40 were *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* and *Kocuria marina*. The highest and lowest infections were respectively to *Klebsiella oxytoca* and *Kocuria marina* with the frequency of 56.6% and 20% respectively. Due to the large number of infected samples, mastitis is one of the most destructive diseases in livestock industry and its treatment costs high expense for humans.

Keywords: Bovine mastitis, Mastitis, Cow`s dairy, *Enterobacter cloacae, Klebsiella oxytoca, Kocuria marina*

1- M.S.c of sciences, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2-Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

*(corresponding author: beheshtimaal@iaufala.ac.ir)

3-Asistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran