شناسایی تیپ‌های *trap* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از نمونه‌های شیر گاو و گوسفند مبتلا به ورم پستان در شمال غرب ایران

حبیب دستمالچی‌ساعی[۱*] و سمیه حسین‌زاده[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۸

چکیده

حدت *استافیلوکوکوس اورئوس* اساساً توسط پروتئین‌های مرتبط با دیواره‌ی سلولی و ترشح توکسین‌ها تعیین می‌گردد، که بیان آن‌ها تا حد زیادی توسط سیستم‌های تنظیمی دو جزئی (TCRSs) مثل سیستم‌های تنظیم ژنی فرعی (*agr*) و RAP-TRAP تنظیم می‌شود. تاکنون چهار واریانت آللی از *agr* (*agr* I-IV) و *trap* (*trap* 1-4) شناسایی شده است. برخی از گزارش‌ها اظهار داشته‌اند که تمایلات بالینی بر طبق هر گروه *agr* وجود دارد، اما اطلاعات محدودی در مورد تیپ‌های *trap* وجود دارد. از این رو در این مطالعه، پلی‌مورفیسم لوکوس *trap* در جمعیتی متشکل از ۴۳ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد ورم پستان گاو (n=۲۱) و گوسفند (n=۲۲) و غیر مرتبط از نظر اپیدمیولوژیک از طریق PCR اندونوکلئاز تعیین حدودی بررسی شد. کل چارچوب قرائت باز ۵۰۴ جفت بازی مربوط به ژن *trap* از همه‌ی جدایه‌ها به واسطه‌ی PCR تکثیر یافت. سپس فرآورده‌های PCR با *Mse*I مورد هضم تعیین حدودی قرار گرفتند، که دو الگوی مختلف منطبق بر تیپ‌های ۲ و ۳ مربوط به *trap* ایجاد شد. جدایه‌های گاوی در تیپ‌های ۲ (۱۳؛ ۶۱/۹٪) و ۳ (۸؛ ۳۸/۱٪) مربوط به *trap* طبقه‌بندی شدند. اکثر جدایه‌های به دست آمده از گوسفندان متعلق به تیپ ۲ *trap* (۹۰/۹٪) بوده و تیپ ۳ تنها ۹/۱٪ از جدایه‌های گوسفندی را شامل شد. به طور کلی، تیپ‌های ۲ و ۳ به ترتیب ۷۶/۷٪ و ۲۳/۳٪ از جدایه‌های مورد بررسی را شامل شدند. قابل توجه این که تیپ‌های ۱ و ۴ در بین جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی نشدند. به طور خلاصه برخی از تیپ‌های *trap* احتمالاً به دلیل داشتن نوعی زمینه‌ی ژنتیکی که آن‌ها را قادر می‌سازد تا غده‌ی پستان را آلوده سازند، در موارد ورم پستان از شیوع بالاتری برخوردارند.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، ورم پستان، تیپ‌های *trap*، ایران

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از معمول‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی ورم پستان بالینی و تحت بالینی در دام‌های شیری (گاو، گوسفند، بز) است (Leitner et al. 2011). بیماری‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* روند پیچیده‌ای است که سنتز پروتئین‌های مرتبط با سطح (که در اتصال باکتری به بافت‌های میزبان نقش دارند) و نیز ترشح توکسین‌ها (که نه تنها در ایجاد بیماری بلکه در انتشار باکتریایی مؤثرند) را شامل می‌شود (Novick 2000). قابلیت باکتری در تعویض بین بیان مولکول‌های چسبندگی سطحی و مولکول‌های توکسین خارجی (Lowy 1998) اساساً توسط نوعی مولکول RNA تحت عنوان RNAIII تنظیم می‌گردد. تحقیقات نشان داده‌اند که RNAIII عموماً از طریق نوعی مکانیسم جفت شدن بازی آنتی‌سنس[۱] عمل می‌نماید (Boisset et al. 2007). RNAIII حداقل توسط دو سیستم دو جزئی (TCS[۲])، یکی (AgrC-AgrA) کد شده توسط لوکوس *agr*[۳]

[۱*] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی و گروه زیست فنآوری سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی زیست فنآوری، دانشگاه ارومیه
E-mail: hdsaei561@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

1- Antisense bases pairing
2- Two-component system (TCS)
3- Accessory gene regulator (*agr*)

(سیستم تنظیم ژنی فرعی) و دیگری (هدف پروتئین فعال کننده-RNAIII [TRAP[1]]-پروتئین فعال کننده-RNAIII [RAP[2]]) کد شده از خارج این لوکوس فعال می‌گردد (Novick et al. 1993, Balaban et al. 2001). جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را می‌توان بر اساس چند شکلی *agrD* و *agrC* به چهار گروه اصلی *agr* (*agr* I-IV) تقسیم‌بندی نمود. برخی از مطالعات نقش سیستم‌های تنظیمی از جمله *agr* را در ورود باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به داخل سلول‌های اپیتلیال پستان گاو و القاء آپوپتوز در آن‌ها را نشان داده‌اند (Wesson et al. 1998). هم‌چنین عنوان شده است که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* متعلق به *agr* گروه I در مقایسه با سویه‌های متعلق به گروه‌های II، III و IV با کارآیی بالایی در سلول‌های اپیتلیال وارد شده و می‌توانند به تعداد زیاد در بافت غده‌ی پستان بقاء یابند (Buzzola et al. 2007). از این رو به نظر می‌رسد که نوع سیستم تنظیمی در سازش و بقا جرم در میزبان و بافت خاص می‌تواند مؤثر باشد. سیستم دو جزئی RAP-TRAP نیز در واقع نوعی سیستم تنظیمی است که برای اولین بار توسط Balaban و Novick در سال ۱۹۹۵ توصیف شد. RAP نوعی پروتئین با وزن حدود ۳۸ کیلودالتون است که در طول تمام مراحل رشد باکتریایی ترشح می‌شود و زمانی که میزان تولید RAP به حد آستانه رسید باعث فسفریلاسیون نوعی پروتئین مرتبط با غشا با وزنی حدود ۲۱ کیلو دالتون، به نام TRAP می‌گردد که از ۱۶۷ بنیان اسید آمینه ساخته شده است. TRAP در سیستم دو جزئی به عنوان نوعی حس‌گر برای RAP عمل می‌نماید (Gov et al. 2001). فسفریلاسیون TRAP، با مکانیسم ناشناخته، موجب فعال شدن سیستم تنظیم ژنی فرعی (*agr*) و در نتیجه سنتز RNAIII و افزایش تولید یک سری از اگزوتوکسین‌ها و اگزوآنزیم‌ها می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند که لوکوس *trap* دارای پلی‌مورفیسم است و جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* را بر این اساس می‌توان به چهار تیپ *trap* طبقه‌بندی نمود (Gilot et al. 2002). هم‌چنین تحقیقات نشان داده‌اند که مهار سیستم RAP-TRAP توسط آنتی‌بادی‌ها یا مهار کننده‌های پپتیدی یک راهکار درمانی بسیار مؤثر است و می‌توان از آن به عنوان جایگزینی برای درمان آنتی‌بیوتیکی استفاده نمود (Korem et al. 2003, Yang et al. 2003). در این خصوص مشخص شده است که حدت *استافیلوکوکوس اورئوس* را می‌توان به وسیله‌ی نوعی هپتاپپتید به نام پپتید ممانعت کننده-RNAIII (RIP)[3] مهار نمود. این پپتید آنالوگ RAP است و در اتصال به TRAP با آن رقابت می‌نماید که این امر موجب ممانعت از سنتز RNAIII و در نتیجه کاهش حدت باکتری می‌گردد (Balaban et al. 2001)، به طوری که در نوعی مدل پیوند در رت، پپتید RIP به طور مؤثر از آلودگی پیوند توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم در برابر متی‌سیلین جلوگیری نموده است (Balaban et al. 2007). هم‌چنین مشخص شده است که سیستم‌های تنظیمی از طریق تنظیم بیان ژن‌ها در جایگزینی و سازش با شرایط محیطی مختلف نقش دارند. به عنوان مثال مطالعات اخیر روی نمونه‌های انسانی نشان داده‌اند که *استافیلوکوکوس اورئوس* احتمالاً از طریق سازگاری تنظیمی[4] به محیط بینی می‌تواند در حفره‌ی بینی، جایگزین گردد (Burian et al. 2010a, Burian et al. 2010b)، از این رو گروه‌بندی اجرام بیماری‌زا بر اساس شیوع فیلدی اطلاعات مهمی در ارتباط با تکامل هم‌زمان میزبان و جرم بیماری‌زا فراهم می‌سازد که این موضوع به نوبه خود تنوع ژنتیکی میکروارگانیسم‌های عامل بیماری را تحت تأثیر قرار می‌دهد . در مطالعه‌ی Mullarky و

1- Target of RNAIII-activating protein (TRAP)
2- RNAIII-activating protein (RAP)
3- RNAIII-inhibiting peptide (RIP)
4- Regulatory adaptation

همکاران در سال ۲۰۰۱ گروه‌بندی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد ورم پستان گاو، بر اساس ژن کد کننده‌ی کواگولاز و نیز ژن *agr* نشان داد که قابلیت نوتروفیل‌ها در از بین بردن ژنوتیپ‌های مختلف *استافیلوکوکوس اورئوس* بسته به میزان شیوع‌شان متفاوت است (Mullarky et al. 2001)، لذا با توجه به نقش مهم *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد ورم پستان و نیز اهمیت سیستم‌های تنظیمی در سازش باکتری به شرایط محیطی مختلف به واسطه تنظیم بیان ژن‌ها، در این مطالعه پلی‌مورفیسم در لوکوس تنظیمی *trap* به منظور مشخص نمودن تیپ *trap* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد ورم پستان گاو و گوسفند بررسی شد.

مواد و روش کار

جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

در کل ۴۳ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در این تحقیق استفاده شد. این جدایه‌ها قبلاً از موارد ورم پستان گاو و گوسفند و از مناطق مختلف در شمال غرب ایران جداسازی شده بودند (Saei et al. 2009, Saei et al. 2013). به طور خلاصه جدایه‌های گاوی مربوط به ۹ گله واقع در مناطق تبریز و ارومیه و جدایه‌های گوسفندی مربوط به ۹ گله واقع در مناطق تبریز، ارومیه و میاندوآب بودند که پس از جداسازی از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی استاندارد شناسایی شدند و به منظور تأیید تشخیص، مورد بررسی بیش‌تر با تکثیر ژن اختصاصی گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* *aroA* (Marcos et al. 1999) و *nuc* (Brakstad et al. 1992) قرار گرفته بودند.

استخراج DNA از جدایه‌های باکتریایی

برای این منظور، جدایه‌ها روی محیط آگار خون‌دار به صورت خالص کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اطمینان از خلوص جدایه‌ها اقدام به استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (فرمنتاز، آلمان) گردید. روند استخراج بر اساس پروتوکل شرکت سازنده کیت انجام گرفت. غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بر مبنای جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه و غلظت نهایی در ۵۰ ng/µl تنظیم شد.

تکثیر ژن *trap* به روش PCR

تکثیر ژن *trap* به روش PCR و با استفاده از جفت پرایمری که قبلاً توسط Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ طراحی شده بود، انجام گرفت (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (CORBETT, Australia) انجام گردید. واکنش با استفاده از کیت PCR ساخت شرکت سیناژن در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس، هم‌چنین پرایمرهای F و R هر کدام به مقدار ۰/۴ میکرومولار (سنتز شده توسط شرکت سیناژن)، ۸/۵ میکرولیتر از آب دیونیزه استریل و ۱۰۰ نانوگرم از نمونه‌ی DNA استخراج شده از باکتری انجام گرفت. از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 به عنوان کنترل مثبت و هم‌چنین از آب مقطر استریل به جای کنترل منفی استفاده گردید. الگوی دمایی به کار رفته جهت تکثیر ژن *trap* بر طبق روش Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام گردید که شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه؛ ۳۵ سیکل دمایی هر کدام شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه مرحله‌ی اتصال در دمای ۵۲°C به مدت ۱ دقیقه و مرحله‌ی توسعه در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه؛ و در نهایت مرحله‌ی توسعه‌ی نهایی جهت کامل شدن واکنش در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (Gilot et al. 2002).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن trap و اندازه‌ی فرآورده‌ی حاصل از تکثیر

پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول PCR (bp)	رفرنس
پرایمر F	5'-ACA TAA GGG GGA CCT TTC AT-3'	۵۰۴	Gilot et al. (2002)
پرایمر R	5'-ACC AAT GGA AGT TTT CTT CG-3'		

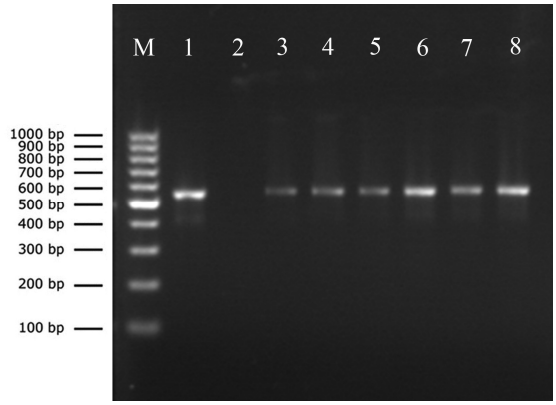
الکتروفورز نمونه‌های مذکور در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه و در ژل آگاروز ۱/۲ درصد انجام گرفت. اندازه‌ی فرآورده‌ی حاصل از تکثیر توسط مارکر ۱۰۰bp (Fermentas, Germany) مشخص گردید . سپس فرآورده‌های حاصل از تکثیر تا زمان هضم آنزیمی در دمای ۲۰°C- قرار داده شدند.

هضم فرآورده‌های حاصل از تکثیر ژن *trap* با آنزیم تعیین حدودی *Mse*I

هضم آنزیمی محصولات حاصل از تکثیر ژن *trap* براساس روش Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از آنزیم تعیین حدودی *Mse*I انجام گرفت. برای این منظور ۱۰-۸ میکرولیتر از فرآورده‌ی تکثیر یافته به همراه ۶U آنزیم تعیین حدودی *Mse*I در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. در نهایت ۸ میکرولیتر از فرآورده‌ی هضم شد روی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) الکتروفورز شد و سپس الگوی هضمی مربوط به هر نمونه در زیر دستگاه فرابنفش مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در مجموع ۴۳ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* موجود در آزمایشگاه میکروب‌شناسی پس از اطمینان از خالص بودن مورد استخراج DNA ژنومی قرار گرفته و ژن *trap* با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر داده شد. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *trap*، قطعه‌ای به اندازه‌ی ۵۰۴ جفت باز را در تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه تکثیر دادند. در مورد کنترل منفی که در آن از آب مقطر استریل به جای DNA استفاده شده بود، هیچ باندی مشاهده نگردید، اما در خصوص کنترل مثبت که از *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213 استفاده شده بود، باند مورد انتظار مشاهده شد (تصویر ۱).

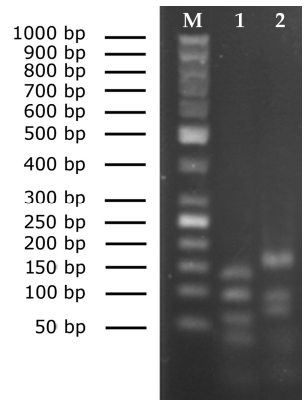


تصویر ۱: الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن trap. چاهک M: 100 bp DNA ladder، چاهک ۱: کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213)، چاهک ۲: کنترل منفی (آب مقطر به جای اسید نوکلئیک)، چاهک‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، و ۸: قطعه ۵۰۴ جفت باز حاصل از تکثیر ژن trap در برخی از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه.

الگوهای RFLP به دست آمده از هضم تعیین حدودی فرآورده *trap* توسط آنزیم *Mse*I

هضم تعیین حدودی فرآورده‌های PCR با استفاده از آنزیم تعیین حدودی *Mse*I موجب شکسته شدن محصولات در تمام ۴۳ جدایه مورد مطالعه شد. به دنبال هضم، دو الگوی RFLP به دست آمد که با الگوهای هضمی به دست آمده در مطالعه‌ی Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ مقایسه شده و تیپ *trap* مشخص گردید (تصویر ۲). جالب این که الگوهای به دست آمده از این

هضم آنزیمی تنها شامل دو تیپ از چهار تیپ شناسایی شده *trap* توسط Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ بود که براساس سیستم نام‌گذاری آن‌ها تحت عناوین تیپ ۲ و تیپ ۳ مربوط به *trap* نام‌گذاری شدند.



تصویر ۲: الگوهای RFLP به دست آمده از هضم تعیین حدودی فرآورده‌های حاصل از تکثیر ژن trap. چاهک M: 50 bp DNA ladder، چاهک ۱: الگوی هضمی مربوط به تیپ ۲. چاهک ۲: الگوی هضمی مربوط به تیپ ۳.

به طور کلی بر اساس نتایج به دست آمده، از ۲۱ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* گاوی، ۱۳ جدایه الگوی ۲ و ۸ جدایه الگوی تیپ ۳ مربوط به *trap* را نشان دادند. در مورد ۲۲ جدایه گوسفندی، ۲۰ و ۲ جدایه به ترتیب الگوی تیپ ۲ و تیپ ۳ مربوط به *trap* را داشتند. نکته‌ی جالب توجه این که هیچ کدام از جدایه‌ها الگوی مربوط به تیپ ۳ و تیپ ۴ *trap* را نشان ندادند. توزیع تیپ‌های *trap* در میزبان‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲: توزیع تیپ‌های trap در جدایه‌های به دست آمده از موارد ورم پستان گاو و گوسفند

میزبان	تعداد جدایه‌ها	تیپ *trap*	
		۲	۳
گاو	۲۱	۱۳	۸
گوسفند	۲۲	۲۰	۲
کل	۴۳	۳۳	۱۰

بحث

به طور کلی باکتری‌ها از طریق بیان ژن که براساس برهم‌کنش شبکه‌های تنظیمی مختلف کنترل می‌گردد، به محرک‌های محیطی واکنش نشان می‌دهند (Burian et al. 2010b)، در این مطالعه پلی‌مورفیسم در لوکوس تنظیمی *trap* در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد ورم پستان گاو و گوسفند بررسی شد. همچون مطالعه‌ی قبلی (Gilot et al. 2002) قطعه‌ای با اندازه‌ی مورد انتظار ۵۰۴ جفت باز به دنبال تکثیر ژن *trap* از ۴۳ جدایه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه به دست آمد. در مطالعه‌ی انجام شده توسط Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ به دنبال هضم تعیین حدودی فرآورده‌ی حاصل از تکثیر ژن *trap* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاصل از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان، ۴ تیپ مختلف از ژن *trap* به دست آمد که تیپ ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۷۱/۸، ۱۸/۳، ۷ و ۲/۸ درصد از جدایه‌ها را شامل شدند. بنابراین تیپ ۱ به عنوان الگوی غالب در نظر گرفته شد. از این رو در مطالعه‌ی حاضر به منظور آنالیز تنوع ژنتیکی، فرآورده‌ی PCR حاصل از تکثیر ژن *trap* با استفاده از آنزیم تعیین حدودی *Mse*I هضم شد. به دنبال هضم تعیین حدودی تنها دو نوع الگوی RFLP به دست آمد که بر اساس سیستم نام-گذاری Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ به عنوان تیپ-های ۲ و ۳ در نظر گرفته شدند. به طور کلی در مطالعه‌ی حاضر، تیپ ۲ و تیپ ۳ مربوط به *trap* به ترتیب در ۷۶/۷ درصد و ۲۳/۳ درصد از کل جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی شدند. این موضوع نشان می‌دهد که این تیپ‌ها دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد تا بافت پستان را آلوده سازند. چنین ارتباطی بین گروه‌های تنظیمی *agr* و برخی از عفونت‌ها، به عنوان مثال وفور بالای جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* متعلق به *agr* گروه II در بیماران مبتلا به اندوکاردیت عفونی (Jarraud et al. 2002) و شیوع فراوان *agr* گروه I

در عفونت‌های گوش (Yoon et al. 2007) قبلاً گزارش شده است. در ارتباط با گاوان و گوسفندان شیری نیز نشان داده شده است که چندین سویه از *استافیلوکوکوس اورئوس* در درون و در بین گله‌های مختلف، حتی با وجود بعد مسافت طولانی، مشترک می‌باشند. وجود چنین سویه‌های غالب *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان می‌دهد که این کلون‌ها ویژگی‌های خاص، به ویژه ژن‌های خاص مرتبط با حدت دارند که به واسطه‌ی آن‌ها می‌توانند بر سیستم‌های دفاعی میزبان غلبه کنند و با موفقیت موجب استقرار عفونت داخل پستانی در میش‌ها، بزها و گاوان گردند (Stephan et al. 2001, Vautor et al. 2003).

از آنجایی که دستگاه تنفس فوقانی یک مخزن احتمالی برای آلودگی پستان و شیر در فارم‌های شیری است (Vautor et al. 2005)، در مطالعه‌ی دیگری که روی ۲۶ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از حفره‌ی بینی گاو، گوسفند و بز انجام گرفت، مشخص شد که تیپ *trap* در ۸۰/۸ درصد جدایه‌ها از نوع ۲ است. از این رو به نظر می‌رسد تیپ ۲ مربوط به سیستم تنظیمی RAP-TRAP از قابلیت سازش بیش‌تری در مقایسه با سایر تیپ‌ها به ناحیه‌ی بینی و بافت پستان نشخوارکنندگان برخوردار است که برای اثبات این موضوع لازم است تحقیقات جامع‌تری انجام گیرد.

در این مطالعه در بین ۴۳ جدایه مورد مطالعه، تیپ ۱ مربوط به *trap* شناسایی نشد که این موضوع با نتایج حاصل از Gilot و همکاران در سال ۲۰۰۲ مبنی بر غالب بودن تیپ ۱ در موارد ورم پستان گاو هم‌خوانی ندارد (Gilot et al. 2002). این امر می‌تواند ناشی از تفاوت‌های جغرافیایی باشد. در تأیید این مطلب مطالعات متعدد روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم در برابر متی‌سیلین نشان داده‌اند که در توزیع گروه‌های تنظیمی *agr* در مناطق جغرافیایی مختلف، اختلاف وجود دارد (Dufour et al. 2002, Gomes et al. 2005).

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، تیپ‌های ۲ و ۳ مربوط به *trap* در بافت پستان هر دو میزبان گاو و گوسفند از وفور بیش‌تری برخوردار بودند که احتمالاً نشان‌دهنده‌ی وجود ویژگی خاص بافتی و نه ویژگی خاص میزبانی این تیپ‌ها می‌باشد. ویژگی خاص بافتی در مورد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از موارد ورم پستان در گونه‌های میزبانی مختلف (گاو، گوسفند و بز) را قبلاً Van Leeuwen و همکاران در سال ۲۰۰۵ با به کارگیری روش Ht-AFLP[1] گزارش داده‌اند.

به طور خلاصه در مطالعه‌ی حاضر جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاصل از موارد ورم پستان گاو و گوسفند از نظر تیپ *trap* بررسی و نشان داده شد که برخی از تیپ‌های تنظیمی *trap* احتمالاً از سازگاری بیش‌تری جهت جایگزینی در بافت پستان برخوردارند. به منظور روشن شدن نقش سیستم‌های تنظیمی در استقرار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غده‌ی پستان گونه‌های دامی مختلف، اجرای مطالعات جامع‌تر روی جمعیت دامی بیش‌تر و نیز مطالعه‌ی سیستم‌های تنظیمی دیگر ضروری است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت مالی حوزه‌ی معاونت پژوهشی و نیز پژوهشکده‌ی زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

1- High-throughput amplified fragment length polymorphism (Ht-AFLP)

منابع

Balaban, N.; Cirioni, O.; Giacometti, A.; Ghiselli, R.; Braunstein, J.B.; Silvestri, C. et al. (2007). Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51 (6): 2226-2229.

Balaban, N.; Goldkorn, T.; Gov, Y.; Hirshberg, M.; Koyfman, N.; Matthews, H.R. et al. (2001). Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). The Journal of Biological Chemistry, 276 (4): 2658-2667.

Balaban, N. and Novick, R.P. (1995). Translation of RNAIII, the *Staphylococcus aureus agr* regulatory RNA molecule, can be activated by a 3'-end deletion. FEMS Microbiology Letters, 133 (1-2): 155-161.

Boisset, S.; Geissmann, T.; Huntzinger, E.; Fechter, P.; Bendridi, N.; Possedko, M. et al. (2007). *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. Genes and Development, 21 (11): 1353-1366.

Brakstad, O.G.; Aasbakk, K. and Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. Journal of Clinical Microbiology, 30 (7): 1654-1660.

Burian, M.; Rautenberg, M.; Kohler, T.; Fritz, M.; Krismer, B.; Unger, C. et al. (2010a). Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. The Journal of Infectious Diseases, 201 (9): 1414-1421.

Burian, M.; Wolz, C. and Goerke, C. (2010b). Regulatory adaptation of *Staphylococcus aureus* during nasal colonization of humans. PLoS ONE, 5 (4): e10040.

Buzzola, F.R.; Alvarez, L.P.; Tuchscherr, L.P.; Barbagelata, M.S.; Lattar, S.M.; Calvinho, L. et al. (2007). Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. Infection and Immunity, 75 (2): 886-891.

Dufour, P.; Gillet, Y.; Bes, M.; Lina, G.; Vandenesch, F.; Floret, D. et al. (2002). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clinical Infectious Diseases, 35 (7): 819-824.

Gilot, P.; Lina, G.; Cochard, T. and Poutrel, B. (2002). Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. Journal of Clinical Microbiology, 40 (11): 4060-4067.

Gomes, A.R.; Vinga, S.; Zavolan, M. and de Lencastre, H. (2005). Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49 (1): 366-379.

Gov, Y.; Bitler, A.; Dell'Acqua, G.; Torres, J.V. and Balaban, N. (2001). RNAIII inhibiting peptide (RIP), a global inhibitor of *Staphylococcus aureus* pathogenesis: structure and function analysis. Peptides, 22 (10): 1609-1620.

Jarraud, S.; Mougel, C.; Thioulouse, J.; Lina, G.; Meugnier, H.; Forey, F. et al. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. Infection and Immunity, 70 (2): 631-641.

Korem, M.; Sheoran, A.S.; Gov, Y.; Tzipori, S.; Borovok, I. and Balaban, N. (2003). Characterization of RAP, a quorum sensing activator of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters, 223 (2): 167-175.

Leitner, G.; Krifucks, O.; Kiran, M.D. and Balaban, N. (2011). Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. Veterinary Immunology and immunopathology, 142 (1-2): 25-35.

Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. The New England Journal of Medicine, 339 (8): 520-532.

Marcos, J.Y.; Soriano, A.C.; Salazar, M.S.; Moral, C.H.; Ramos, S.S.; Smeltzer, M.S. et al. (1999). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. Journal of Clinical Microbiology, 37 (3): 570-574.

Mullarky, I.K.; Su, C.; Frieze, N.; Park, Y.H. and Sordillo, L.M. (2001). *Staphylococcus aureus agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. Infection and Immunity, 69 (1): 45-51.

Novick, R.P.; Ross, H.F.; Projan, S.J.; Kornblum, J.; Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. The EMBO Journal, 12 (10): 3967-3975.

Novick, R.; Pathogenicity factors of *Staphylococcus aureus* and their regulation. In: Fischetti V. (2000). Gram-positive pathogens. ASM Press, Washington, D.C. pp: 392–407.

Saei, H.D.; Aghdasi, S. and Mohammad-Zadeh, H. (2013). Frequency analysis of adhesin genes *cna*, *fnbA* and *fnbB* in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from sheep mastitis. Iranian Veterinary Journal, 9 (1): 19-29.

Saei, H.D.; Ahmadi, M.; Mardani, K. and Batavani, R.A. (2009). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Veterinary Microbiology, 137 (1-2): 202-206.

Stephan, R.; Annemuller, C.; Hassan, A.A. and Lammler, C. (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. Veterinary Microbiology, 78 (4): 373-382.

Van Leeuwen, W.B.; Melles, D.C.; Alaidan, A.; Al-Ahdal, M.; Boelens, H.A.; Snijders, S.V. et al. (2005). Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 187 (13): 4584-4591.

Vautor, E.; Abadie, G.; Guibert, J.M.; Chevalier, N. and Pepin, M. (2005). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. Veterinary Microbiology, 106 (3-4): 235-239.

Vautor, E.; Abadie, G.; Guibert, J.M.; Huard, C. and Pepin, M. (2003). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. Veterinary Microbiology, 96 (1): 69-79.

Wesson, C.A.; Liou, L.E.; Todd, K.M.; Bohach, G.A.; Trumble, W.R. and Bayles, K.W. (1998). *Staphylococcus aureus* Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. Infection and Immunity, 66 (11): 5238-5243.

Yang, G.; Cheng, H.; Liu, C.; Xue, Y.; Gao, Y.; Liu, N. et al. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* pathogenesis in vitro and in vivo by RAP-binding peptides. Peptides, 24 (11): 1823-1828.

Yoon, H.J.; Choi, J.Y.; Lee, K.; Yong, D.; Kim, J.M. et al. (2007). Accessory gene regulator group polymorphisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an association with clinical significance. Yonsei Medical Journal, 48 (2): 176-183.

Characterization of *trap* types in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and ovine mastitis milk samples in the North West of Iran

Dastmalchi Saei, H.[1] and Hosseinzadeh, S.[2]

Received: 04.09.2013 Accepted: 09.03.2014

Abstract

The virulence of *Staphylococcus aureus* is essentially determined by cell wall associated proteins and secreted toxins, whose expression is largely regulated by two-component regulatory systems (TCRSs) such as accessory gene regulator (*agr*) and RAP-TRAP systems. Four allelic variants of *agr* (*agr* I-IV) and *trap* (*trap* 1-4) so far have been identified. Some reports state that there are clinical trends according to each *agr* group, but there is a scarcity of information about *trap* types. So in this study, the polymorphism of the *trap* locus was analyzed by restriction endonuclease PCR in a population of 43 epidemiologically unrelated *S. aureus* isolated from bovine (n=21) and ovine (n=22) mastitis. The entire 504-bp open reading frame of the *trap* gene was amplified from all isolates by PCR. The PCR products were then digested with *Mse*I, giving two different profiles corresponding to *trap* types 2 and 3. Isolates from cow were classified in *trap* types 2 (13; 61.9%) and 3 (8; 38.1%). The vast majority of isolates recovered from sheep belonged to *trap* type 2 (90.9%) and type 3 contained only 9.1% of the sheep isolates. In general, types 2 and 3 accounted for 76.7% and 23.3% of the analyzed isolates, respectively. It is worth noting that *trap* types 1 and 4 were not detected among the studied isolates. In conclusion some *trap* types were highly prevalent in mastitis cases probably because of possession of a genetic background which endows them with superior ability to infect the mammary gland.

Key words: *Staphylococcus aureus*, Mastitis, *Trap* types, Iran

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine and Department of Cellular and Molecular Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Iran
2- PhD Student of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Iran
Corresponding Author: Dastmalchi Saei, H., E-mail: HDSaei561@gmail.com