مقاله کامل
دوره نوزدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۴۰۲
DOI: 10.22055/IVJ.2022.350219.2478

مقایسه تعداد سلول‌های پیکری و آلودگی به *استرپتوکوکوس یوبریس* در نمونه‌های شیر مخزن گاوداری‌های شیری استان اصفهان

محمود احسانی[1*]، مسعود قربانپور[2]، محمدرضا محزونیه[2] و ناصر شمس[3]

[1] دانشجوی دکترای باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[2] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[3] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۳ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۳۱

چکیده

استرپتوکوکوس یوبریس یک باکتری گرم مثبت و از عوامل مهم التهاب پستان در گاو می‌باشد. این باکتری در گله‌های گاو شیری فاقد برنامه‌های کنترلی التهاب پستان، یکی از مهم‌ترین عوامل خسارات اقتصادی محسوب می‌شود. به منظور ارزیابی حضور این عامل در شیر مخزن گاوداری‌های استان اصفهان و تعیین ارتباط آن با تعداد تام باکتری‌ها و سلول‌های پیکری موجود در شیر، تعداد ۱۰۰ نمونه شیر مخزن جمع‌آوری گردید. تعداد تام باکتری‌ها و سلول‌های پیکری موجود در نمونه تعیین گردید و میزان آلودگی به *استرپتوکوکوس یوبریس* با روش‌های کشت معمول و RT-PCR برآورد گردید. نتایج حاصل از RT-PCR و کشت به ترتیب آلودگی ۲۰ و ۱۶ نمونه به *استرپتوکوکوس یوبریس* نشان داد. تمام نمونه‌هایی که کشت باکتریایی مثبت شده بود، RT-PCR نیز نتیجه مثبت داشت ولی ۶ نمونه فقط در RT-PCR مثبت بودند که دال بر حساسیت بیشتر RT-PCR نسبت به کشت است. آنالیز آماری نشان داد بین میزان آلودگی به *استرپتوکوکوس یوبریس* و تعداد سلول‌های پیکری موجود در شیر ارتباط معنی‌داری وجود دارد ولی حضور این باکتری تأثیر معنی‌داری بر تعداد تام باکتری‌های موجود در نمونه‌ی شیر ندارد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که *استرپتوکوکوس یوبریس* در گاوداری‌های شیری استان اصفهان حضور داشته و لازم است در روش‌های پایش و کنترل ورم پستان بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس یوبریس*، التهاب پستان، کشت باکتریایی، RT-PCR، گاو

مقدمه

نیاز به دانستن وضعیت سلامتی گله‌های شیری برای افزایش تولید و پایداری گله ضروری است در میان بیماری‌های مؤثر بر گاوهای شیری، آماس پستان هنوز هم مهم‌ترین عارضه‌ای است که به طور قابل توجهی بر سودآوری دامداران نیز تأثیر می‌گذارد (Goncalves et al, 2018; Pulina et al, 2017; Summer et al, 2015). التهاب غدد پستان یا ماستیت شایع‌ترین بیماری گاوهای شیری است که معمولاً ناشی از عفونت‌های باکتریایی است و به انواع واگیردار و محیطی، درمانگاهی و تحت درمانگاهی و مزمن قابل تقسیم‌بندی می‌باشد. این بیماری بیش‌ترین خسارت اقتصادی را به صنعت لبنیات در جهان وارد می‌سازد. خسارات اقتصادی التهاب پستان، ناشی از کاهش

*نویسنده مسئول : محمود احسانی، دانشجوی دکترای باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
E-mail: ehsani.mahmoud@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

تولید شیر، حذف شیر، حذف دام‌های بیمار، درمان و غیره می‌باشد (Kumar et al, 2017). خسارت سالانه ورم پستان تقریباً ۱۲۴ یورو به ازای هر گاو تخمین زده می‌شود که باعث ضرر سالیانه تا ۱۲۵ میلیارد یورو در سراسر جهان می‌شود (Fenske et al, 2022).

استرپتوکوکوس یوبریس از جمله عوامل بیماری‌زای عفونی محیطی و مسری ورم پستان است که در سراسر جهان مسئول بسیاری از موارد ورم پستان درمانگاهی و تحت درمانگاهی در گاوهای شیرده شناخته می‌شود و همچنین ارگانیسم غالب جدا شده از غدد پستانی در دوره خشکی می‌باشد (Esener et al, 2018). این باکتری در بیشتر محیط‌ها وجود دارد و از قسمت‌های مختلف بدن گاو (لوزه‌ها، دستگاه تناسلی، شکمبه، رکتوم و پوست گاو) بستر، خاک و وسایل مورد استفاده در گله‌های شیری جدا شده است. این باکتری می‌تواند با استقرار در سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی و گریز از دستگاه ایمنی باعث التهاب مزمن پستان شود (Reinoso, 2017).

استرپتوکوکوس یوبریس در سراسر جهان و به ویژه در سیستم‌های باز (چرا در مرتع) یکی از عوامل معمول التهاب پستان گاو است (Verbeke et al, 2014) که وقوع آن در تابستان به اوج می‌رسد (Riekerink et al, 2007). شواهد نشان می‌دهد این باکتری برای بقاء و القاء بیماری در شرایط اکولوژیکی مختلف سازگار است (Ward et al, 2009) و اهمیت نسبی آن طی دهه‌های گذشته در بسیاری از نقاط جهان، برخلاف عواملی مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* افزایش یافته است (Ruegg, 2012).

روش‌های مبتنی بر کشت هنوز در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی دامپزشکی برای تشخیص عوامل ورم پستان استفاده می‌شود ولی اخیراً سایر روش‌های تشخیصی عوامل باکتریایی التهاب پستان رایج‌تر شده‌اند. از روش RT-PCR می‌توان مثل کشت، عوامل التهاب پستان موجود در شیر مخزن را به عنوان شاخصی برای ارزیابی سلامت پستان، بهداشت شیردوشی و شرایط نگهداری شیر در مزرعه استفاده کرد. علاوه بر این، با PCR می‌توان در نمونه‌های شیر مخزن، باکتری‌های با شیوع کمتر را نیز ردیابی نمود (Katholm et al, 2012). در مقایسه با روش‌های مبتنی بر کشت، PCR سریع‌تر و حساس‌تر است و نتایج آن، در عرض چهار ساعت قابل ارائه خواهد بود (Koskinen et al, 2010). پژوهش‌ها نشان داده است که PCR در ۴۳ تا ۴۷ درصد از نمونه‌های شیر ورم‌پستانی که در کشت معمولی منفی بوده‌اند، مثبت می‌گردد (Bexiga et al, 2011; Taponen et al, 2009).

در مطالعه پیش‌رو با روش کشت و RT-PCR میزان آلودگی شیر مخزن گاوداری‌های استان اصفهان به باکتری *استرپتوکوکوس یوبریس* مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط این آلودگی با تعداد سلول‌های پیکری شیر مخزن (Bulk tank milk somatic cell count) و تعداد باکتری‌های تام (Bulk tank milk total bacterial count) آن مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری

با همکاری شرکت شیر پگاه اصفهان در ماه آذر و دی سال ۱۴۰۰ تعداد ۱۰۰ نمونه شیر از مخرن اصلی جمع‌آوری شیر دامداران استان اصفهان جمع‌آوری گردید. برای این منظور، شیر مخرن به وسیله همزن به خوبی مخلوط می‌شد و نمونه در سه ظرف فالکون استریل در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل می‌گردید.

شمارش سلول‌های پیکری و تعداد تام باکتری‌ها

هر نمونه بلافاصله بعد از نمونه‌گیری در آزمایشگاه شرکت پگاه اصفهان با استفاده از دستگاه‌های Foss-5000 و باکتواسکن ساخت کشور دانمارک به ترتیب مورد شمارش تعداد سلول‌های پیکری و تعداد تام باکتری‌های موجود در نمونه قرار گرفت.

کشت و جداسازی *استرپتوکوکوس یوبریس*

نمونه‌های شیر اخذ شده پس از انتقال به آزمایشگاه در کنار یخ و قبل از کشت به خوبی مخلوط گردید و سپس زیر هود و در کنار شعله ده میکرولیتر از شیر به روش خطی در محیط‌های کشت ادوارد (مرک، آلمان) حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و کروم آگار GP ویژه جداسازی باکتری‌های گرم مثبت عامل ورم‌پستان (کروم‌آگار، فرانسه) کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. کلونی‌های باکتریایی مشکوک به *استرپتوکوکوس یوبریس* (خاکستری تا سیاه در محیط ادوارد و آبی پررنگ در محیط کروم آگار) شمارش و جهت کشت‌های تفریقی خالص‌سازی شدند (Figure 1). مرفولوژی و واکنش‌های گرم، همولیز، کاتالاز، هیدرولیز اسکولین و CAMP (با *استافیلوکوکوس اورئوس*) جدایه‌های خالص شده تعیین گردید و باکتری‌هایی که کوکسی گرم مثبت، کاتالاز منفی، واجد همولیز آلفا (ناقص)، آسکولین مثبت و CAMP منفی بود *استرپتوکوکوس یوبریس* در نظر گرفته شد و با پرایمرهای اختصاصی، مورد تأیید مولکولی (PCR) نیز قرار گرفتند.

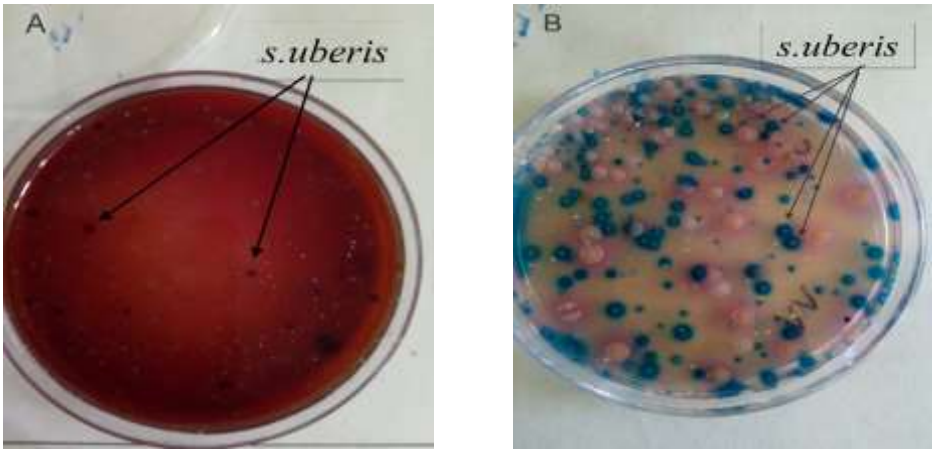


Figure 1: Colony morphology of *Streptococcus uberis* **in Edwards Medium (A) and Chrom Agar Mastitis GP Medium (B).**

واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز در زمان واقعی (RT-PCR)

استخراج DNA باکتری از شیر با کیت تجاری استخراج DNA (شرکت رها زیست پادتن، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت پذیرفت.

در این تحقیق مطابق روش Gillespie و Oliver از ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن *S. uberis* شامل پرایمرهای آغازگر 5′-AGAGGAATTCATCATGTTTTAACA-3′ و معکوس 5′-AATTGTAGAAGAACCATTTGATGT-3′ برای شناسایی *S. uberis* استفاده شد (Gillespie and Oliver, 2005). در هر بار آزمایش، به عنوان کنترل منفی از آب فاقد DNA و از سویه استاندارد *استرپتوکوکوس یوبریس* (IBRC-M 10804) که از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی تهران تهیه گردیده بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. واکنش‌ها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس RB SYBR qPCR (زیست فن آوران، ایران)، ۱ میکرولیتر (10 pM) از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر DNA و ۶/۵ میکرولیتر آب PCR بود. چرخه‌های دمایی واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، تعداد ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در ۹۵°C، ۲۵ ثانیه، اتصال در ۵۷°C، ۴۰ ثانیه و طویل‌سازی در ۷۲°C، ۴۵ ثانیه و در نهایت طویل‌سازی نهایی در ۷۲°C برای ۵ دقیقه و در انتهای سیکل برای نمودار منحنی ذوب با دمای بالا HRMC (High Resolution Melt Curve) چرخه‌های

دمای شامل ۹۵°C برای ۱۵ ثانیه، ۶۰°C برای یک دقیقه و ۹۵°C برای ۱۵ ثانیه بود.

برای بررسی کارایی (efficiency) پرایمرها و آنالیز داده-های ریل تایم، نمودار منحنی استاندارد رسم گردید. برای این کار رقت‌های مختلف از DNA خالص باکتری استاندارد *استرپتوکوکوس یوبریس* (IBRC-M 10804) تهیه گردید. سپس برای آن‌ها تست RT-PCR انجام شد و از CTهای حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید (Figure 2).

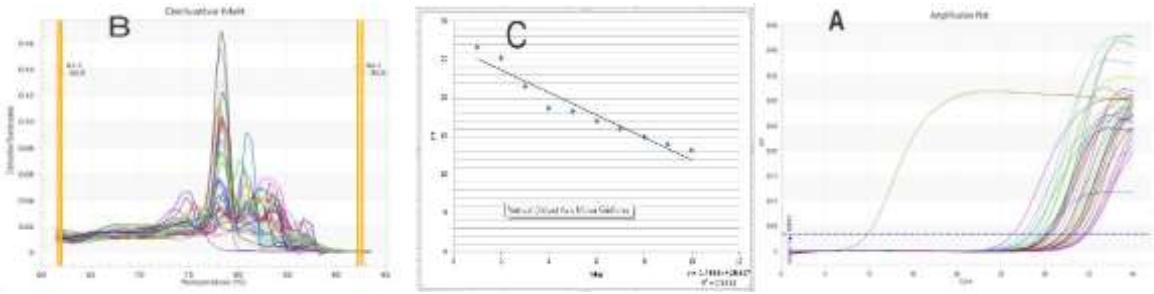


Figure 2: Amplification plot (A), High Resolution Melt Curve (B) and Standard curve (C) of plasminogen activator gene in Real-time PCR for diagnosis of *Streptococcus uberis*

تجزیه و تحلیل‌ها داده‌ها با نرم افزار SPSS 24 و روش آماری آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) با سطح اطمینان ۹۵ درصد (P≤0.05)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر مخزن کشت داده شده، تعداد ۱۴ نمونه در کشت و آزمایشات تکمیلی بیوشیمیایی و مولکولی آلوده به *استرپتوکوکوس یوبریس* تشخیص داده شد. در RT-PCR نیز ۲۰ نمونه (شامل ۱۴ نمونه کشت مثبت و ۶ نمونه کشت منفی) مثبت بودند (Table 1)، که حاکی از آن است که روش RT-PCR به خوبی قادر به تشخیص آلودگی به *استرپتوکوکوس یوبریس* در نمونه‌های شیر می‌باشد. پس از شمارش تعداد سلول‌های پیکری و تعداد تام باکتری‌های موجود در نمونه (Table 2) تجزیه و تحلیل آماری نشان داد بین تعداد سلول‌های پیکری شیر مخزن و آلودگی به *استرپتوکوکوس یوبریس* اختلاف معنی‌داری (P=0.047) وجود دارد (Figure 3) ولی حضور یا عدم حضور این باکتری در شیر بر تعداد تام باکتری‌ها تأثیر معنی‌داری (P=0.112) ندارد.

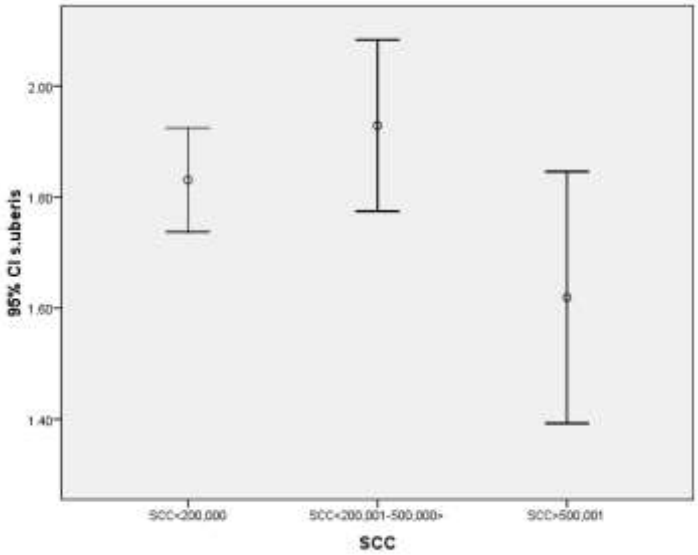
Table 1: Comparison between microbiological culture and molecular examination

Examination	Positive	Negative	Total
RT-PCR	20	80	100
Culture	14	86	100

Table 2: The bulk tank milk somatic cell count and total bacterial count and contamination with *s.uberis*

	SCC					TBC				
s.uberis	SCC≤200,000	SCC<200,001-500,000>	SCC>500,001	Total	P value	TBC ≤1,000,000	TBC <1,000,001-5,000,000>	TBC >5,000,001	Total	P value
Positive	11	1	8	20	0.047*	11	1	8	20	0.112
Negative	54	13	13	80		55	10	15	80	
Total	65	14	21	100		66	11	23	100	

SCC: Somatic cell count, TBC: Total bacterial count
*P < 0.05 was considered significant



SCC: Somatic cell count, CI: Confidence interval
Figure 3: A significant difference between the number of bulk tank milk somatic cell count and contamination with *Streptococcus uberis*

بحث

باکتری‌های موجود در شیر مخزن ممکن است از پستان گاو یا آلودگی‌های محیطی هنگام شیردوشی، پردازش و فرآوری شیر منشأ گرفته باشند (Naing et al, 2019). نمونه‌برداری از مخزن جمع‌آوری شیر اقتصادی‌ترین و ساده‌ترین روش برای ارزیابی حضور عوامل بیماری‌زا در یک گله در نظر گرفته شده است. شمارش تام باکتریایی و سلول‌های پیکری در مخزن جمع‌آوری شیر، که به طور منظم در طی یک دوره زمانی انجام شود، ابزاری مفید برای ارزیابی کیفیت شیر و نظارت بر وضعیت سلامت پستان در یک گله محسوب می‌شود (Jayarao and Wolfgang, 2003). شناسایی به موقع باکتری‌های بیماری‌زا در کنترل و درمان ورم‌پستان در گله‌های شیری از اهمیت بالایی

برخوردار است (Constable et al, 2008). روش رایج تشخیص عوامل ورم‌پستان کشت و جداسازی عامل بیماری است که استاندارد طلایی در نظر گرفته می‌شود ولی پرزحمت و زمان‌بر است (De Vliegher et al, 2012) و محدودیت‌هایی نیز دارد. از محدودیت‌های کشت می‌توان به سخت رشد بودن و نیاز برخی باکتری‌های عامل ورم پستان به محیط‌ها و شرایط خاص، احتمال موفق نبودن کشت به دلیل کم بودن تعداد باکتری در نمونه، حضور آنتی‌بیوتیک در نمونه شیر و انتقال نامناسب نمونه به آزمایشگاه اشاره نمود. طبق گزارشات، حداقل در ۲۰ تا ۳۰ درصد از نمونه‌های شیر ورم‌پستانی، جداسازی موفقیت‌آمیز نیست (Phuektes et al, 2001; Sears et al, 1990). این میزان در مطالعه‌های Bradley و همکاران (۲۰۰۷) در انگلستان، Hogan و همکاران (۱۹۸۹) در ایالات متحده، Koivula و همکاران (۲۰۰۷) در فنلاند، Nevala و همکاران (۲۰۰۴) در فنلاند و Riekerink و همکاران (۲۰۰۸) در کانادا، این رقم به ترتیب ۲۶/۵ ، ۲۷/۲، ۲۳/۷، ۲۷/۱ و ۴۳/۹ درصد بوده است. این میزان در مورد ورم پستان‌های تحت درمانگاهی که معمولاً شایع‌ترند، بیش‌تر است، به عنوان مثال در تحقیقات Koivula و همکاران (۲۰۰۷)، Bradley و همکاران (۲۰۰۷) و Makovec و Ruegg (۲۰۰۳) به ترتیب، ۲۸/۷، ۳۸/۶ و ۴۹/۷ درصد گزارش شده است.

در پژوهش حاضر، ۳۰ درصد مواردی که در کشت *استرپتوکوکوس یوبریس* منفی بودند، در RT-PCR مثبت تشخیص داده شدند. در توافق با یافته فوق، در خصوص حساسیت بیش‌تر RT-PCR در مقایسه با کشت، Soltau و همکاران نیز گزارش نموده‌اند که آزمایش نمونه‌های شیر مخازن گاوداری شیری با RT-PCR یک روش قابل اعتماد برای تشخیص عوامل بیماری‌زای پستانی موجود در گله به خصوص برای باکتری‌هایی که شیوع کمی دارند، می‌باشد (Soltau et al, 2017). در تحقیقات متعدد (Bi et al, 2016; Gillespie and Oliver, 2005; Koskinen et al, 2010; Svennesen et al, 2018) نیز به برتری RT-PCR نسبت به کشت اشاره و عنوان شده است که RT-PCR به خوبی قادر به شناسایی باکتری‌های دخیل در التهاب پستان بوده و در مقایسه با روش کشت رایج، از دقت بسیار بالاتری برخوردار است. نتایج مطالعه Gillespie و Oliver در سال ۲۰۰۵ نشان می‌دهد که روش RT-PCR، می‌تواند یک روش تشخیصی جایگزین برای شناسایی *استرپتوکوکوس یوبریس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد. Phuektes و همکاران در سال ۲۰۰۳، PCR چندگانه را روشی مناسب برای شناسایی عوامل اصلی التهاب پستان برآورد نموده‌اند. Koskinen و همکاران (۲۰۰۹) نیز با استفاده از روش RT-PCR تعداد یازده باکتری مهم عامل التهاب پستان در گاوهای شیری را مورد آزمایش قرار داده‌اند و به این نتیجه رسیده‌اند که RT-PCR دارای دقت بسیار بالا برای تشخیص باکتری‌های عامل ورم پستان بوده و جایگزین مناسبی برای کشت معمولی می‌باشد.

تعداد سلول‌های پیکری موجود در شیر، معیار مفیدی جهت تشخیص عفونت داخل پستانی می‌باشد. میزان ۷۵ درصد این سلول‌ها، لکوسیت (نوتروفیل، ماکروفاژ، لنفوسیت) و ۲۵ درصد گلبول‌های قرمز و سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشند. لکوسیت‌ها در پاسخ به عفونت باکتریایی، آسیب بافتی و استرس افزایش می‌یابند و حیوان را در مبارزه با اجرام عفونی، محافظت می‌نمایند (Sharma et al, 2011). اگر چه در مطالعات متعددی (Erskine et al, 1987; Keefe, 1997; Patchara Phuektes et al, 2003; Rysanek et al, 2009; Ryšánek et al, 2009; Zadoks et al, 2004) گزارش شده است که ارتباطی بین حضور باکتری‌های عامل ورم پستان با SCC و شمارش تام باکتریایی بالا وجود دارد، اما در مطالعه پیش رو این ارتباط بین تعداد سلول‌های پیکری و آلودگی *استرپتوکوکوس یوبریس* دیده شد که علت می‌تواند به نوع نمونه‌های مورد استفاده برگردد. در تحقیق حاضر نمونه‌های شیر مربوط به مخزن بود و اگر بر روی شیر کارتیه یا شیر انفرادی هر گاو مطالعه مشابهی صورت گیرد، انتظار می‌رود ارتباط بیش‌تری

بین شمارش تام سلول‌های پیکری و باکتریایی و آلودگی به *استرپتوکوکوس یوبریس* دیده شود. Katholm و همکاران با بررسی، تعداد ۲۵۸۴ نمونه شیر مخزن گله‌های شیری، با روش RT-PCR نتیجه‌گیری نموده‌اند که آلودگی بالا (CT پایین در RT-PCR) به *استرپتوکوکوس یوبریس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* با شمارش تام باکتری‌ها و سلول‌های پیکری موجود در شیر مرتبط است (Katholm et al, 2012).

در مجموع با توجه به تحقیق حاضر، می‌توان اعلام نمود که آلودگی به *استرپتوکوکوس یوبریس* در گاوداری‌های شیری استان اصفهان شایع بوده و پیشنهاد می‌گردد، در روش‌های پایش و کنترل ورم پستان مورد توجه افراد ذیربط قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات آقای دکتر ناصر حیدری مسئول فنی بهداشتی شرکت پگاه اصفهان و کارکنان محترم آزمایشگاه دامپزشکی صدرا اصفهان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

قسمتی از منابع مالی این پژوهش در قالب پایان نامه از محل اعتبار پژوهانه سال ۱۴۰۱ دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد و مابقی توسط نویسنده مقاله تهیه گردیده است.

منابع

De Vliegher, S., 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*(3), 1025-1040.

Erskine, R., Eberhart, R., Hutchinson, L., & Spencer, S. (1987). Herd management and prevalence of mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *190*(11), 1411-1416.

Esener, N., Green, M. J., Emes, R. D., Jowett, B., Davies, P. L., Bradley, A. J., et al. (2018). Discrimination of contagious and environmental strains of *Streptococcus uberis* in dairy herds by means of mass spectrometry and machine-learning. *Scientific Reports*, *8*(1), 17517.

Fenske, L., Noll, I., Blom, J., Ewers, C., Semmler, T., Fawzy, A., et al. (2022). A dominant clonal lineage of *Streptococcus uberis* in cattle in Germany. *Antonie Van Leeuwenhoek*.

Bexiga, R., Koskinen, M. T., Holopainen, J., Carneiro, C., Pereira, H., Ellis, K. A., et al. (2011). Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *Journal of Dairy Research*, *78*(1), 49-55.

Bi, Y., Wang, Y. J., Qin, Y., Guix Vallverdu, R., Maldonado Garcia, J., Sun, W., et al. (2016). Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. *PLoS One*, *11*(5), e0155621.

Bradley, A., Leach, K., Breen, J., Green, L & ,. Green, M. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Record*, *160*(8), 253-258.

Constable, P., Pyörälä, S., & Smith, G. (2008). Guidelines for antimicrobial use in cattle. *Guide to Antimicrobial Use in Animals. L. Guardabassi, LB Jensen, and H. Kruse, ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK*, 143-160.

Gillespie, B., & Oliver, S. (2005). Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science, 88*(10), 3510-3518.

Goncalves, J. L., Cue, R. I., Botaro, B. G., Horst, J. A., Valloto, A. A., & Santos, M. V .(۲۰۱۸) .Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. *Journal of Dairy Science, 101*(5), 4357-4366.

Jayarao, B. M., & Wolfgang, D. R. (2003). Bulk-tank milk analysis. A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, 19*(1), 75-92, vi.

Katholm, J., Bennedsgaard, T. W., Koskinen, M. T., & Rattenborg, E. (2012). Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science, 95*(10), 5702-5708.

Keefe, G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian Veterinary Journal, 38*(7), 429.

Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S., & Mäntysaari, E. A. (2007). Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agriculturae Scand Section A, 57*(2), 89-96.

Koskinen, M., Wellenberg, G., Sampimon, O., Holopainen, J., Rothkamp, A ,.Salmikivi, L., et al. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science, 93*(12), 5707-5715.

Koskinen, M. T., Holopainen, J., Pyorala, S., Bredbacka, P., Pitkala, A., Barkema, H. W., et al. (2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science, 92*(3), 952-959.

Kumar, N., Manimaran, A ,.Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Sreela, L., Mooventhan, P., et al. (2017). Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. *Tropical Animal Health and Production, 49*(4), 663-673.

Makovec, J. A., & Ruegg, P. L. (2003). Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science, 86*(11), 3466-3472.

Naing, Y. W., Wai, S. S., Lin, T. N., Thu, W. P., Htun, L. L., Bawm, S., et al. (2019). Bacterial content and associated risk factors influencing the quality of bulk tank milk collected from dairy cattle farms in Mandalay Region. Food Science & Nutrition, 7(3), 1063-1071.

Phuektes, P., Browning, G. F., Anderson, G., & Mansell, P. D. (2003). Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *Journal of Dairy Research, 70*(2), 149-155.

Phuektes, P., Mansell, P., & Browning, G. (2001). Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science, 84*(5), 1140-1148.

Pulina, G., Francesconi, A. H. D., Stefanon, B., Sevi, A., Calamari, L., Lacetera, N., et al. (2017). Sustainable ruminant production to help feed the planet. *Italian Journal of Animal Science, 16*(1), 140-171.

Reinoso EB (2017) Bovine mastitis caused By *Streptococcus uberis*: Virulence factors and biofilm. J Microb Biochem Technol 9:237-243.

Riekerink, R. O., Barkema, H., Kelton, D & ,.Scholl, D. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science, 91*(4), 1366-1377.

Riekerink, R. O., Barkema, H., & Stryhn, H. (2007). The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science, 90*(4), 1704-1715.

Ruegg, P. L. (2012). New perspectives in udder health management. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 28*(2), 149-163.

Rysanek, D., Zouharova, M., & Babak, V. (2009). Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Research, 76*(1), 117-123.

Ryšánek, D., Zouharová, M., & Babák, V. (2009). Major mammary pathogens as contributors to total bacterial counts in raw milk. *Acta Veterinaria Brno, 78*(3), 455-461.

Sears, P. M., Smith, B. S., English, P. B., Herer, P. S., & Gonzalez, R. N. (1990). Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science., 73*(10), 2785-2789.

Sharma, N., Singh ,N., & Bhadwal, M. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24*(3), 429-438.

Soltau, J., Einax, E., Klengel, K., Katholm, J., Failing, K., Wehrend, A., et al. (2017). Within-herd prevalence thresholds for herd-level detection of mastitis pathogens using multiplex real-time PCR in bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Science, 100*(10), 8287-8295.

Summer, A., Franceschi, P., Formaggioni, P., & Malacarne, M. (2015). Influence of milk somatic cell content on Parmigiano-Reggiano cheese yield. *Journal of Dairy Research, 82*(2), 222-227.

Svennesen, L., Mahmmod, Y. S., Skjolstrup, N. K., Mathiasen, L. R., Katholm, J., Pedersen, K., et al. (2018). Accuracy of qPCR and bacterial culture for the diagnosis of bovine intramammary infections and teat skin colonisation with *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* using Bayesian analysis. *Preventive Veterinary Medicine, 161*, 69-74.

Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen , M., & Pyörälä, S. (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science, 92*(6), 2610-2617.

Verbeke, J., Piepers, S., Supré, K., & De Vliegher, S. (2014). Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *Journal of Dairy Science, 97*(11), 6926-6934.

Ward, P. N., Holden, M. T., Leigh, J. A., Lennard, N ,.Bignell, A., Barron, A., et al. (2009). Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics, 10*(1), 1-17.

Zadoks, R., Gonzalez, R., Boor, K., & Schukken, Y. (2004). Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. *Journal of Food Protection, 67*(12), 2644-2650.

Received: 04.07.2022
Accepted: 22.08.2022

Vol. 19, No. 4, Winter, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2022.350219.2478

The comparison of somatic cell count and infection with *Streptococcus uberis* in dairy farms tank milk samples in Isfahan province

Mahmoud Ehsani[1*], Masoud Ghorbanpoor[2], Mohammad Reza Mahzounieh[2] and Naser Shams-Esfandabadi[3]

[1] PhD Student of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[3] Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 04.07.2022 Accepted: 22.08.2022

Abstract

Streptococcus uberis is a Gram-positive bacterium and the major cause of mastitis in dairy cattle. This bacterium is one of the most important causes of economic losses in dairy herds with no ordinary monitoring program for mastitis. In order to evaluate the presence of this agent in the bulk tank milk of dairy cattle farms in Isfahan province and to find out its relationship with the total bacterial and somatic cells count, 100 tank milk samples were collected. The total bacterial and somatic cells were detected in the samples and the level of infection to *S. uberis* was evaluated by conventional culture and RT-PCR methods. The results of RT-PCR and culture showed infectivity of 20 and 16 samples to *S. uberis*, respectively. All culture positive samples were also positive in RT-PCR, but 6 samples were only positive in RT-PCR, indicating that RT-PCR is more sensitive than culture. Statistical analysis showed that there is a significant relationship between the infectivity to *S. uberis* and the total somatic cells, but the presence of this bacterium had no significant effect on the total number of bacteria in milk samples. It can be concluded that *S. uberis* is usually present in dairy farms of Isfahan province and it is necessary to pay more attention to the methods of monitoring and controlling the mastitis cows.

Key words: *Streptococcus uberis*, Mastitis, Real-Time PCR, Bacterial culture, Cattle

* **Corresponding Author**: Mahmoud Ehsani, PhD Student of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
E-mail: ehsani.mahmoud@gmail.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).