بررسی مولکولی ژن های (CspB،CspA و Spb1) استرپتوکوکوس اکوئی جدا شده از نمونه های تنفسی اسب های مبتلا به عفونت حاد تنفسی به روش مولتی پلکس پی سی آر

علی شمسی زاده میمندی[۱]، محمد مزروعی سبدانی[۲]، بابک خیرخواه*[۲]، احسان استبرقی[۲]

چکیده

استرپتوکوکوس اکوئی یک پاتوژن مهم بیماریزا در اسب است که با عفونتهای دستگاه تنفسی و رحمی در مادیان می باشد. هدف این تحقیق بررسی مولکولی شناسایی ژن های حدت (CspB،CspA و Spb1) استرپتوکوکوس اکوئی جدا شده از نمونه های تنفسی اسبهای مبتلا به عفونت حاد تنفسی به روش مولتی پلکس پی سی آر Multiplex-PCR بود. مطالعه حاضربه صورت توصیفی-مقطعی بود، از بین اسبهای مبتلا به عفونت تنفسی فوقانی با درگیری به استرپتوکوکوس اکوئی جمع آوری شد. بلافاصله جهت آزمونهای تشخیصی به محیط کشت اولیه و محیط کشت پایه بلادآگار حاوی خون۱۰٪ گوسفند منتقل شدند. واکنش Multiplex-PCRبر روی تمام ٤٠ جدایه استرپتوکوکوس اکوئی جدا شده از اسبها انجام شد. وجود ژنهای CspB،CspA و Spb1 در جدایه های تحت مطالعه با روش Multiplex-PCR مشاهده شد. ژنهای CspA و CspB در تمامی جدایه ها (۱۰۰٪) حضور داشت ولی ژن Spb1 در هیچ یک از جدایه ها یافت نشد. مقاومت آنتی بیوتیکی در استرپتوکوکوس اکوئی در حال افزایش روزافزون بوده و وضعیت نسبت به داروهای تتراسایکلین (۳۵ ٪ مقاومت)، استرپتومایسین(۱۲/۵ ٪ مقاومت)، پنی سیلین(۵ ٪ مقاومت)، اریترومایسین(۷/۵ ٪ مقاومت) مشاهده شد. در تحقیق حاضر شناسایی دو ژن CspB,CspA در استرپتوکوکوس اکوئی و در سلولهای اپتلیال پوششی بافتهای آلوده به باکتری با روش مولتی پلکس مشاهده شدند. میزان حضور ژنها نشان می دهد که این سه ژن CspB, CspA و Spb1 ، بیش از دیگر ژنها در حدت و ویرولانس باکتری موثر بوده و بعنوان فاکتور مهم حدت بیماری و تشدید بیماری است.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس اکوئی، عفونت تنفسی اسب

تاریخ دریافت: ۱٤۰۲/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۲/۱۲/۲٦

مقدمه

باکتریهای استرپتوکوکوس جنس مهمی ازدسته باکتریهای گرم مثبت است. واژه ی یونانی استرپتوس به معنای زنجیره به خوبی بیانگر ویژگی اسم باکتری است(۱). برای اولین بار استرپتوکوکوسها توسط بیلروت درسال ۱۸۷٤ از ترشحات اگزودای بادسرخ و عفونتهای زخم جداسازی شد. استرپتوکوکوس¬های موجود در زنجیره از طریق پلهای بین سلولی به هم متصل می شوند(۲). بیماری ناشی از استرپتوکوکوس اکوئی Streptococcus equiدر سال ۱۲۵۱ توسط فردی بنام Jordanus Ruffus به عنوان بیماری خفه شدن اسبها گزارش شد. اگرچه عامل باکتری استرپتوکوکوس اکوئی زیر گونه اکوئی است، یکی از پرهزینه ترین عوامل عفونی در جهان بوده و عفونت دستگاه تنفسی فوقانی را بدنبال دارد(۳). استرپتوکوکوس÷اکوئی عامل بیماری استرانگل (Strangles) در اسب‌ها و استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس Streptococcus zooepidemicus موجب عفونت در اغلب پستانداران مانند اسب‌ها و گوساله‌ها و گوسفندان و سایر موجودات می‌شود. عوامل مختلفی در محیط وجوددارد که سبب ایجاد عفونتهای تنفسی(پنومونی) در اسب شده که باید مهم در نظر گرفته شود. یک باور عمومی وجود دارد و آن اینست که بیماری اغلب با کاهش دمای محیط و افزایش رطوبت همراه است. اگرچه عموماً مشخص شده که بیماری

۱ - دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بافت، شهربابک، ایران.

۲*-دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بافت، شهربابک، ایران. babakkheirkhah@gmail.com

تنفسی درزمان های مشخصی از سال و تحت شرایط آب و هوایی خاصی رخ می دهد، اخیراً تلاش هایی صورت گرفته تا دلیل آن بدقت بررسی و مشخص گردد(٤). رابطه بین فصل و بیماری تنفسی احتمالا تا حدی به دلیل تاثیرات مدیریتی بخصوص نگهداری اسبها در مجاورت و فاصله کم با یکدیگر است که در نتیجه به شکل‌گیری و انتقال عفونت کمک می‌کند. اغلب مشکل تنفسی با یک افت ناگهانی دما در ٢٤ تا ٧٢ ساعت قبل از ابتلا همراه است. پنومونی در کره اسب‌ها بسیار جدی است و اغلب در کره‌های تا سنین حدود هشت ماه کشنده است. در اسب‌های بالغ، رایج‌ترین دلیل پنومونی باکتری استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس است، ولی در کره‌های جوان، رایج‌ترین علت باکتریایی استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس به همراه رودوکوکوس اکوئی باعث بیماری شدید و سختی می‌شوند که همه‌گیر و واگیردار است(٥).

پنومونی باکتریایی برخی اوقات به دنبال عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی یا حادثه‌های تنش‌زا که باعث کاهش مکانیسم دفاعی طبیعی ریه می‌شوند بروز می کند. استرپتوکوکوسها عامل فارنژیت (گلودرد) و سایر عفونت‌های تب زا مشابه استرپتوکوک‌های گروه A است. آنتی ژن ترشحی استرپتوکوکSSA، که شامل اگزوتوکسین تب زا استرپتوکوکوس از (SPE-A) A-Cو دسته دیگری شامل -G تا -J ترشحی است. اعتقاد بر این است که چندین گونه آللی اگزوتوکسین Z میتوژنیک استرپتوکوکوس (SMEZ) نقش مهمی به عنوان فاکتورهای حدت در برخی از این بیماریها ایفا می کنند. اخیراً دو اگزوتوکسین تب زا در باکتری استرپتوکوکوس اکوئی SePE-H و SePE-I شناسایی شدند(٦). سموم ترشحی تقریباً مشابه SPE-H و SPE-I در استرپتوکوکوس هستند و به ترتیب در SPE-H فقط با ٣ اسید آمینه (aa) و در سم SPE-Iفقط با یک اسید آمینه متفاوت هستند. باکتری استرپتوکوکوس اکوئی از گروه C لانسفیلد طبقه بندی استرپتوکوکهاست که بعنوان یک عامل بیماری التهابی مسری دستگاه تنفسی فوقانی و غدد لنفاوی در اسب دیده می شود(٧). نمونه های شناسایی شده در موارد عفونت و ژنوم استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس (SEZ) مناطق ژنومی حدت و تولید توکسین یافت شده که به دلیل جهش ژنومی یا حذف ژنی مشاهده شده است. اولین آزمایش مبتنی بر PCR که برای باکتری استرپتوکوکوس اکوئی(SEE) صورت می گیرد که در ناحیه ٥' ژن SeM را مورد هدف قرار می دهد. در گذشته تصور می شد که ژن SeM بصورت محافظت شده و بدون تغییر است ولی براساس شواهدی که با تکنیک ساترن بلاتینگ و به کمک آنزیم محدودالاثر HindII صورت گرفته و نشان داد که جهش در این ناحیه نیز رخ داده است. اینگونه تغییرات و حذف ژنومی در تشخیص می تواند پیامدهای زیانباری را برای کنترل بیماریهای عفونی را بدنبال داشته باشد. انتقال ژن با واسطه فاژ (فی φ)به عنوان یک رویداد مهم در شکل گیری ویرولانس و کلونال بیشتر در باکتری استرپتوکوکوس اکوئی(SEE) نسب به نوع استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس قابل مشاهده می باشد(٨).

اقدامات مدیریتی در نگهداری اسبها و این چنین نکاتی باعث کاهش هزینه های درمان و جداکردن دامهای بیمار از سالم بسیار حائز اهمیت است(٩). امروزه با توجه به شیوع بیماری و سرعت همه گیری عفونتهای استرپتوکوکوسی در بین اسبها و نتایج حاصل از این پژوهش کمک زیادی به امر تشخیص و افزایش سرعت شناسایی اسبهای بیمار و ناقل در منطقه کرمان دست خواهیم یافت. در این مطالعه تحقیقی شناسایی ژنهای حدت باکتری بویژه استرپتوکوکوس اکوئی تاثیرات بسیار مهمی در کنترل، تشخیص و درمان عفونتهای تنفسی اسبهای منطقه ایفا می کند. هدف نهایی مطالعه تحقیق بررسی مولکولی شناسایی ژن های حدت (CspB،CspA و Spb1) استرپتوکوکوس

اکوئی جدا شده از نمونه های تنفسی اسب های مبتلا به عفونت حاد تنفسی به روش مولتی پلکس پی سی آر Multiplex-PCR بود.

مواد و روش‌کار

مطالعه حاضر به صورت توصیفی-مقطعی انجام شد. جامعه آماری از بین تمام اسبهای مبتلا به عفونت تنفسی فوقانی ناشی از استرپتوکوکوس اکوئی (٤٠ مورد) در اسبداریهای استان کرمان می باشد.

نمونه برداری و انتقال به آزمایشگاه : نمونه برداری از ٤٠ راس اسب بیمار اسبداریها به طور تصادفی، پس از معاینه توسط دامپزشک متخصص و با اخذ رضایت نامه کتبی از صاحب حیوان انتخاب شدند که طی دو هفته منتهی به مطالعه حاضر آنتی بیوتیک مصرف نکرده باشند. نمونه برداری از محل عفونت موجود در مجاری تنفسی بیماران انجام شد. انتقال نمونه ها در تیوب های استریل جداگانه ای مورد استفاده قرارگرفت. آزمونهای تشخیصی به جهت نمونه برداری با استفاده از یک سواپ استریل بلند پلی آکریل نمونه گیری از مجرای تنفسی فوقانی (بینی = منخرین اسب) صورت گرفت و بلافاصله به محیط کشت اولیه یا پایه (مرک- آلمان) حاوی خون (SBA) انتقال داده شد.تستهای تکمیلی بیوشیمیائی برروی آنها انجام گرفت. نمونه ها برروی محیط های کشت بلاد آگار و نوترینت براث به آزمایشگاه منتقل شدند وآزمایش های تشخیصی وتاییدی بر روی آنها صورت گرفت(١٠).

تست های بیوشیمیایی و تائید سویه های استرپتوکوکوس جمع آوری شده : محیط کشت اولیه یا پایه (مرک- آلمان) حاوی خون (SBA) این محیط کشت حاوی ١٠٪ خون گوسفند بود. (خون گوسفند به این دلیل مورد استفاده قرار گرفت که محیط کشت حاوی خون انسان دارای مواد ضد میکروبی است و باعث از بین رفتن سریع باکتری استرپتوکوکوس می شود(١١). محیط کشت به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٣٧-٣٦ درجه سانتی گراد در حضور ١٠-٨ ٪دی اکسید کربن نگهداری شد. مرحله بعد از کلنی¬های رشد یافته ابتدا رنگ آمیزی گرم و پس از اطمینان از نوع رنگ آمیزی و شکل باکتری (کوکسی گرم مثبت) از کلنی های مورد نظر پاساژ ثانویه تهیه شد. به کمک بررسی تخمیر قندها، اندازه کلنی، نوع همولیز و سایر مشخصات باکتری بررسی شد.

سپس آزمایش کاتالاز روی کلنی خالص صورت گرفت و کلنی های کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی شدند. کشت باکتری جهت استخراج DNA کروموزومی از محیط کشت Meat Cooked استفاده شد.

پس از کشت، محیط کشت به مدت ٢٤ساعت در دمای ٣٠ درجه سانتی گراد و تحت فشار ١٨ درصدی دی اکسید کربن قرار گرفت(١٢). به منظور تایید سویه های استاندارد استرپتوکوکوس اکوئی از تستهای بیوشیمیایی CAMP و هیدرولیز هیپورات سدیم و تخمیر قندهای کلیدی و تست مالتوز و سالیسین در این گونه مثبت بوده و برای تشخیص استرپتوکوکوس اکوئی استفاده شد که سایر تستها منفی بودند. جنس کپسول پلی ساکاریدی و ضد فاگوسیتی استرپتوکوکوس اکوئی مهم ترین فاکتور بیماریزایی و حدت آن است. با تهیه لام و مشاهده باکتری در زیر میکروسکوپ و اطمینان از عدم آلودگی کشت به باکتری های دیگر، سوسپانسیون جهت استخراج DNA کروموزومی استفاده شد.

آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر) : برای تهیه کشت Working control، از کشت ذخیره فریز شده روی پلیت یا آگار شیبدار تلقیح کرده و آن را به مدت یک شبانه روز تا زمانی که رشد مناسبی بدست آید، انکوبه کرد. پلیت یا آگار شیبدار را می‌توان در دمای ٢٨ درجه سانتی گراد یا در دمای اتاق تا مدت ٤ هفته نگهداری کرد و بعد از هر پاساژ، خالص بودن و مورفولوژی کلنی‌ها را بررسی

نمود. پس از تهیه کشت تازه، دیسک‌های آنتی بیوتیک بر روی محیط کشت منتقل شدندو پلیت را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه و بعد از ۲٤– ۱۸ ساعت زیر نور چراغ بررسی شد(۱۳). سپس قطر هاله عدم رشد را با خط کش اندازه گیری کرده و با توجه به جدول همراه دیسک‌ها (تتراسایکلین، استرپتومایسین، پنی سیلین، اریترومایسین)، گزارش تست آنتی بیوگرام بر اساس استاندارد CLSIرا برای هریک از آنتی بیوتیک‌ها به صورت درصد حساس (Susceptible)، مقاوم، (Resistant) و یا نیمه حساس (Intermediate) گزارش گردید(۱٤).

آغازگرها (پرایمرها): با توجه به ویژگی های پرایمر ذکر شده برای انجام Multiplex-PCR در این تحقیق بطور همزمان از ۳ جفت پرایمر برای شناسایی توام ژنهای CspA، CspB و Spb1 استفاده گردید. توالی اولیگوتوکلئوتیدی این پرایمرها در جدول زیر ۱ قید شده است.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق(۱۵)

Gene	Primer sequence (5'-3')[a]	Size of product (bp)
CspA	F: GCTGAGACAGGGACAATTAC R: GTTGAAGGCAACTCAGTACC	**(bp)۲۵۰**
CspB	F: GGTCGCGATAGAGTTTCTTCCGC R: AACGCCTGGGGCTGATTTGGC	**(bp)۱۰۴**
Spb1	F: AGCCATATGCTGCGATCTCT R:GGGTTGAACCAAGTGTGCTT	**(bp) ۱۹۸**

استخراج DNA : ژنوم جدایه های استرپتوکوکی مورد نظر با استفاده از کیت شرکت سیناکلون(cat No:FABGK001) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت: ابتدا کشت ۲٤ساعته باکتری درون میکروتیوبهای ۲ میکرولیتری وارد شد و کلنی از کشت برداشت شده و داخل میکروتیوبی که معمولا حاوی ۳۰۰ میکرولیتر TE بافر است، می گردد و سپس غیر فعال سازی باکتری و بعد استخراج DNA انجام شد. به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. روش مولکولی گسترده Multiplex PCR که برای تکثیر اهداف متعدد در یک آزمایش PCR است. با استفاده از چندین جفت آغازگر در یک مخلوط واکنش، بیش از یک توالی هدف را می‌توان تکثیر کرد.

واکنش زنجیره پلیمراز(PCR) : واکنش زنجیره ای پلیمراز برای حضور ژن های *CspA Spb1* و*CspB* پس از استخراج DNA از *استرپتوکوکوس های* ایزوله شده با استفاده از مواد لازم و برنامه مناسب، واکنش زنجیره ای پلیمراز برای بررسی حضور این ژنها *Spb1,CspA* و*CspB* با پرایمرهای اختصاصی در خصوص هر یک از نمونه باکتری های استرپتوکوکی ایزوله شده استفاده شدکه مطابق دستور العمل کیت استخراج DNA انجام شد.

جدول۲- مراحل دمایی انجام واکنش Multiplex PCR برای *ژنهای Spb1,CspA* و*CspB* باکتری *استرپتوکوکوس اکوئی*(۱۵)

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۴	۴۵	۱
واسرشت	۹۴	۳۰	-
اتصال	۶۰	۶۰	-
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۴۰	۳۰
بازآرایی نهایی	۷۲	۴۸۰	-

برای انجام فرآیند Multiplex PCR درحجم ۲۰ میکرولیتر از محلول واکنش برای هرواکنش ۱/۲۵میکرولیترdNTPs به اضافه ۲/۵میکرولیتر buffer 10x به اضافه ۲/۵میکرولیتر Mgcl2 به اضافه۱۲/۳۵میکرولیتر آب مقطر استریل و به اضافه ۲میکرولیتر از هر پرایمر را با ٤/ ۰میکرولیتر آنزیم

Taqو در نهایت ۲میکرولیتراز DNA مورد استفاده قرار گرفت. پس از آماده سازی مخلوط بالامیکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرارگرفته و مطابق برنامه واسرشتگی در۹٤درجه سانتیگراد به مدت ٤٥ ثانیه اتصال پرایمرها به DNA هدف در٦٠ درجه سانتیگراد بمدت٦٠ ثانیه و طویل شدن در۷۲درجه سانتیگراد بمدت٤٨٠ ثانیه دنبال شد(جدول ۱). الکتروفورز نمونه ها بر روی ژل آگارز۱/۲ ٪ انجام می‌شود سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و مورد ارزیابی قرار گرفت.

واکنش PCR : برای تایید نهایی سویه استرپتوکوکوس از پرایمرهای عمومی زیر استفاده گردید(جدول ۱). سپس محصول PCR به منظور سکانس برای شرکت Bioneer کشور کره جنوبی ارسال گردید و نتیجه سکانس در دیتابیس NCBI، BLAST شد.

برنامه دمایی برای PCR : ترکیب DNA تخلیص شده با حجم مورد نیاز واکنش در یک میکروتیوپ و انتقال میکروتیوپ‌ها به دستگاه ترموسایکر براساس برنامه جدول ۳: شرایط سیکل حرارتی برای PCR اینگونه است که واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (جدول۳و۲). موارد فوق مربوط به جدول ۳ است که جدول هم ایراد دارد و مربوط به جدول ۲ نمی شود. محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند.

جدول۳- برنامه دمایی مخلوط واکنش PCR برای ژن *16srDNA* باکتری *استرپتوکوکوس اکوئی*

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
واسرشت	۹۴	۳۰	-
اتصال	۵۵	۴۵	-
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۶۰	۳۰
بازآرایی نهایی	۷۲	۳۰۰	-

آماده سازی پرایمرها: جهت انجام PCR، در مرحله اول با توجه به تعیین سکانس ژن از سایت NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) گرفته شد و توسط برنامه Gene Runner، پرایمرهای هر ژن طراحی، مقایسه و BLAST گردید، سپس این پرایمرها جهت سنتز به شرکت ماکروژن – ایران سفارش داده شدند.

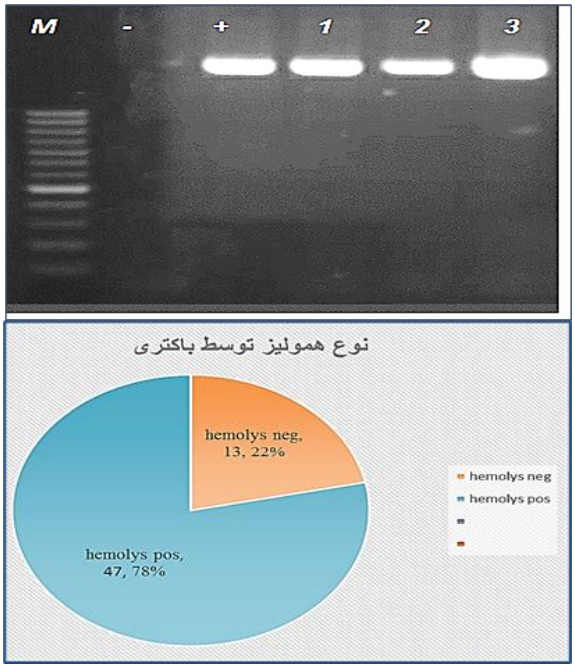
مقادیر واکنش PCR : مقادیر مواد PCR برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x، ۱ میکرولیتر از هرکدام یک از پرایمرها با غلظت۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر، ٤ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ٤ میکرولیتر آب مقطر بود(جدول ٤).

جدول ٤- مخلوط واکنش PCR برای وجود ژنهای ***CspB*،*CspA*** و ***Spb1*** در جدایه ها

نام ژنها	مواد	حجم مورد نظر
	Distilled Water	µl٤
	Master mix	µl۱۰
CspA ***CspB*** ***Spb1***	Forward each Primer (10 pimol)	µl۱
	Reverse each Primer (10 pimol)	µl۱
	DNA Streptococcus	µl٤
	Total volume	µl۲۰

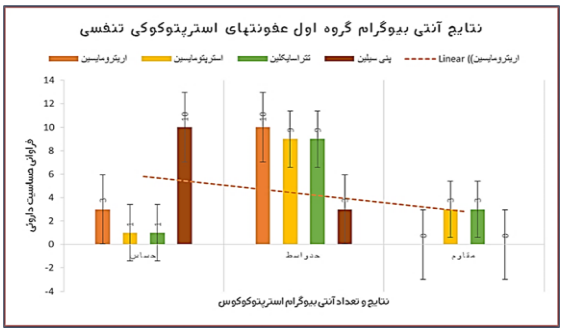
نتایج

تایید صحت استخراج DNA ژنومی : به منظور تایید صحت استخراج DNA، روی محصول استخراج الکتروفورز انجام گردید.



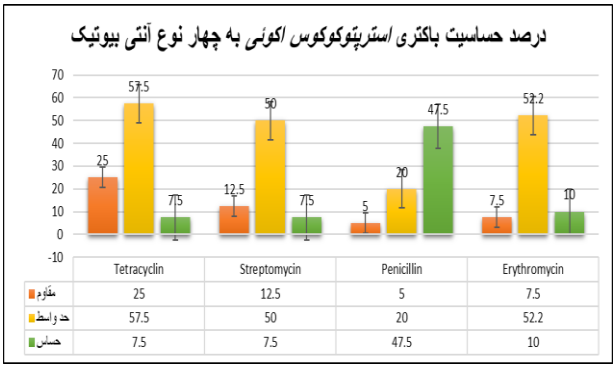
نگاره ۱- بررسی کیفی محصولات ژنومی استخراج شده؛ مشاهده باندهای حاصل از ارزیابی کیفی DNA استخراج شده

نمودارهای زیر(۲و۱) گروه آنتی بیوگرام را به همراه اسامی و سن و جنسیت اسبهای مورد مطالعه در عفونتهای استرپتوکوکوس تنفسی نشان می دهند.



نمودار ۱- نتایج فراوانی حساسیت باکتریها به چهار نوع آنتی بیوتیک مصرفی(تتراسایکلین، استرپتومایسین، پنی سیلین، اریترومایسین)

نتایج آنتی بیوگرام براساس نوع مقاومت در عفونتهای استرپتوکوکوسی اسب : مقاومت در باکتری *استرپتوکوکوس اکوئی* در حال افزایش روزافزون بوده و وضعیت آن نسبت به داروهای **تتراسایکلین** (مقاومت ۲۵ ٪ – حساسیت ۷/۵ ٪ و حد واسط ۵۷/۵ ٪)، **استرپتومایسین**(مقاومت ۱۲/۵ ٪ – حساسیت ۷/۵ ٪ و حد واسط ۵۰ ٪)، **پنی سیلین**(مقاومت ۵ ٪ – حساسیت ۴۷/۵ ٪ و حد واسط ۲۰ ٪)، **اریترومایسین**(مقاومت ۷/۵ ٪ – حساسیت ۱۰ ٪ و حد واسط ۵۲/۵ ٪) مشاهده شد(نمودار۲).

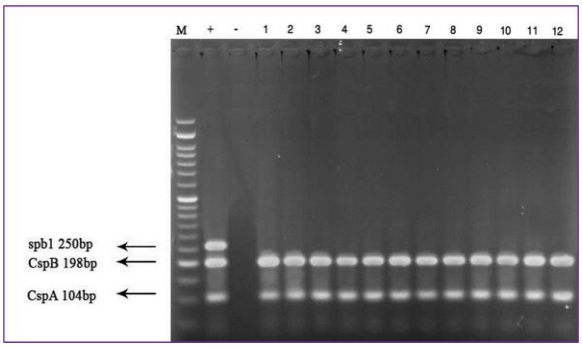


نمودار ۲- نتایج فراوانی درصد حساسیت باکتری *استرپتوکوکوس اکوئی* به چهار نوع آنتی بیوتیک مصرفی در آنتی بیوگرام.

پروفایل حضور ژنهای حدت در جدایه های *استرپتوکوکوس* به روش Multiplex-PCR : در مطالعه حاضر، وجود ژنهای *CspA*، *CspB* و *Spb1* در جدایه های تحت مطالعه از روش Multiplex-PCR استفاده شد. نتایج نشان دادکه ژنهای *CspA* و *CspB* درتمامی جدایه ها (۱۰۰٪) حضور داشت و ژن *Spb1* در هیچ یک از جدایه ها یافت نشد.

جدول ۵- فراوانی ژنهای باکتری *استرپتوکوکوس اکوئی* تحت مطالعه در آزمون Multiplex-PCR

نام ژن	*CspA*	*CspB*	*Spb1*
فراوانی ژنهای باکتری استرپتوکوکوسی	٤٠ (۱۰۰٪)	٤٠ (۱۰۰٪)	۰ (۰٪)



نگاره ۲-: نتیجه Multiplex-PCR اختصاصی جهت شناسایی ژنهای مختلف(*CspA*،*Spb1*،*CspB*) درجدایه های مورد مطالعه. M: مارکر DNA size marker 50bp، کنترل مثبت (*S.agalactiae* ATCC31475) و کنترل منفی (آب مقطر)، چاهک های شماره ۱۲-۱ جدایه های مورد مطالعه.

بحث

شیوع عفونت های تنفسی اسب در جهان کمابیش بین ۰/۸ تا ۸ درصد می باشد که به منطقه زندگی حیوان بستگی دارد. از عوامل محیطی که در ایجاد یا پیشرفت عفونت های تنفسی نقش دارند، عفونت با این میکروارگانیسم ها می باشند. نقش عوامل میکروبی در شروع عفونت های تنفسی حدود یک قرن پیش مطرح شد(۱٦). نتایج این تحقیق نشان دادکه ژنهای *CspA* و *CspB* درتمامی جدایه ها بصورت (۱۰۰٪) حضور داشت ولی ژن *Spb1* که در حدت و نفوذ به سلولهای اپیتلیال تنفسی موثر بوده و چسبندگی و تهاجم به اپیتلیوم تنفسی از عوامل حیاتی در پنومونی تازه متولدین و عفونت سیستمیک است و در همین مرحله اولیه است که Spb1 می‌تواند مزیتی را برای RDP (RestrictionFragment Digest Pattern) ایجاد کند ولی در هیچ یک از جدایه ها یافت نشد.

در نتیجه مطالعات Boyle و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که نتایج بررسی باکتریولوژیک از تشخیص آزمایشی خفه شدن در اسب‌های بیمار از این مطالعه پشتیبانی کرد . همه اسب‌ها علائم بالینی خفگی، از جمله تب، ترشحات چرکی بینی، و بزرگ شدن یا آبسه غدد لنفاوی سر و گردن را نشان دادند. حساسیت و ویژگی آزمایشات تشخیصی بستگی به مرحله عفونت، محل آناتومیکی که نمونه از آن گرفته می شود، تکنیک نمونه برداری و آزمایش مورد استفاده دارد. اگرچه کار خونی می تواند متغیر باشد، یک لکوسیتوز که با نوتروفیلی در شمارش کامل خون یافت می شود و همچنین هیپرفیبرینوژنمی مشخص می شود، می تواند حاکی از عفونت با *S. equi* در هنگام بررسی یک مورد شاخص باشد و باید آزمایش اضافی *S. equi* را تشویق کند(۱۷).

در نتیجه مطالعات Baracco و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که عفونت تحت بالینی یا کلونیزاسیون توسط باکتری *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه زیر گونه اکوئیسیمیلیس* و *استرپتوکوکوس اکوئی* زیرگونه *زوواپیدمیکوس* در سگ های سالم در تماس مکرر با اسب رخ داده است. سه نوع توالی مختلف *استرپتوکوک اکوئی* جدایه های زیرگونه *زوواپیدمیکوس* از سگ های سالم بدست آمد. در حالیکه این دو گونه با هم فرق داشتند و مواردی تازه در این مطالعه در اسب‌ها شناسایی شده‌اند(۱۸).

گزارش‌هایی از Low DE در عفونت‌های انسانی توسط *استرپتوکوکوس زوواپیدمیکوس* را توصیف می‌کنند و به‌عنوان گزارش‌های فردی پراکنده توسط سایر محققین یا به عنوان گزارش‌های گاه به گاه شیوع گسترده همه‌گیر که

افراد متعددی را به دنبال مصرف پنیر آلوده تحت تأثیر قرار می‌دهند، دیده می‌شوند. تظاهرات بالینی متغیر است و ممکن است شامل باشد علائم خفیف دستگاه تنفسی فوقانی، پنومونی، آرتریت سپتیک، سپتی سمی و منتژیت است. در اکثر موارد، راه‌های احتمالی انتقال شامل تماس نزدیک با اسب آلوده یا نوشیدن شیر غیر پاستوریزه بوده است(۱۹). گزارش‌های مشابه، در بررسی انتقال *استرپتوکوکوس زواپیدمیکوس* از حیوانات دیگر به انسان یافت شده است.

McCormick و همکاران در سال ۲۰۰۱ اظهار داشتند که ۸۳ ٪ایزوله های باکتری حاوی ژن کد کننده *speA* ، با فراوانی ۲۱% حاوی ژن کد کننده *speC* و ژن کد کننده *speB* در همه ایزوله ها وجود داشت(۲۰). نتایج مطالعه محققان در مورد ژن *speA* و *speB* تا حدود زیادی در مورد ژن *speC* ، منطبق بر نتایج هایسر و همکاران بوده که نشان داده نتایج این تحقیق با سایر تحقیق هایی که در خصوص ارتباط بیماری عفونت تنفسی و عوامل میکروبی انجام گرفته است، چنین به نظر می رسد که اگزوتوکسین های باکتریایی جدا شده از *استرپتوکوکوس پایوژنز* می تواند به عنوان سوپر آنتی ژن عمل کرده و به افزایش قدرت نفوذ سلول های T و مونوسیت ها در کره اسبها و اسبهای با عفونت تنفسی است و در ایجاد بیماری مؤثر باشند که در این میان نقش ژن های بیماری زا و کد کننده سوپر آنتی ژنهای باکتریایی حائز اهمیت بیشتر می باشند(۲۱). نتایج این تحقیق نشان دادکه ژنهای *CspA* و *CspB* درتمامی جدایه ها بصورت (۱۰۰٪) حضور داشت و ژن *Spb1* در هیچ یک از جدایه ها یافت نشد. آزمایش سرولوژی برای اولین بار توانست شناسایی اسب های با دامنه صعودی و افزایش سطوح آنتی بادی های اختصاصی SeM را شناسایی و عوارض بالقوه، مانند آبسه های عفونی متاستاتیک را با واکسن های حاوی SeM که واکسینه شده اند را تا حد زیادی کاهش دهند(۱۷).

Harris و همکاران در سال ۲۰۱۵ اظهار داشتند؛ تجزیه و تحلیل‌های ژنومی عمیق‌تر جدایه‌های *S. equi* از سراسر جهان نشان می‌دهد که حمل‌ونقل بین‌المللی و اختلاط نژاد اسب‌ها در طول زمان عفونتهای جهانی در قرن نوزدهم و بیستم منجر به پیدایش یک سویه جدید از *S. equi* شده است که از آن همه گونه‌های معاصر حاصل شده است(۲۲). نتایج این تحقیق نشان دادکه ژنهای *CspA* و *CspB* درتمامی جدایه ها بصورت (۱۰۰٪) حضور داشت و ژن *Spb1* در هیچ یک از جدایه ها یافت نشد.

Tscheschlok و همکاران در سال ۲۰۱۸ اظهار داشتند که نقش آنتی بیوتیک ها در درمان مناسب اسب ها با عفونت تنفسی استرانگل موضوع بحث علمی مداوم است زیرا بسیاری از موارد استرانگل که سبب خفه کردن اسب بدون استفاده از داروهای ضد میکروبی می شوند را برطرف می کند. علاوه بر این، تجویز پنی سیلین در هنگام ابتلا به عفونت تنفسی حاد می تواند با تداوم ایمنی هومورال باکتری *S. equi* تداخل کند. اگر درمان ضد میکروبی قطع شود، آبسه ها می‌توانند کندتر ایجاد شوند(۲۳).

در نتیجه این تحقیق، شناسایی ژنهای *CspB,CspA* و *Spb1* در باکتری *استرپتوکوکوس‌ها (گونه اکوئی)* در سلول اپتلیال پوششی در بافتهای آلوده با روش مولتی پلکس صورت گرفت. ژنهای *CspB,CspA* و *Spb1* بعنوان سوپر آنتی ژنهای مهمی هستند که تغییرات آنتی ژنیک مختلفی از طریق آن رخ می دهد.

تقدیر و تشکر : پژوهش حاضر اقتباسی از پایان نامه دکترای حرفه ای دامپزشکی بوده که با کد اخلاقی IR.IAU.KERMAN.REC.1401.060 به ثبت رسیده و در نهایت از حمایت و راهنمایی‌های کلیه عزیزان که در انجام

این پژوهش راهنمایی و مساعدت ارزنده ای داشـتند کمـال تشکر و امتنان را دارم.

فهرست منابع

1. Acke E, Midwinter A, Lawrence K, Gordon S, Moore S, Rasiah I, et al. Prevalence of Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis and S. equi subsp. zooepidemicus in a sample of healthy dogs, cats and horses. New Zealand veterinary journal. 2015;63(5):265-71.
2. Kasithevar M, Periakaruppan P, Muthupandian S, Mohan M. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles against multi-drug resistant clinical isolates from post-surgical wound infections. Microbial pathogenesis. 2017;107:327-34.
3. Kingham MC. Monitoring treatment table hygience in a chiropractic training clinic: University of Johannesburg (South Africa); 2019.
4. Parks DH, Chuvochina M, Chaumeil P-A, Rinke C, Mussig AJ, Hugenholtz P. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. Nature biotechnology. 2020;38(9):1079-86.
5. McVey DS, Kennedy M, Chengappa M. Veterinary microbiology: John Wiley & Sons; 2013.
6. Artiushin S, Timoney J, Sheoran A, Muthupalani S. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of Streptococcus equi. Microbial pathogenesis. 2002;32(2):71-85.
7. Harrington DJ, Sutcliffe IC, Chanter N. The molecular basis of Streptococcus equi infection and disease. Microbes and Infection. 2002;4(4):501-10.
8. Mallicote M. Update on Streptococcus equi subsp equi infections. Veterinary Clinics: Equine Practice. 2015;31(1):27-41.
9. Geor RJ, Harris P, Coenen M. Equine applied and clinical nutrition: health, welfare and performance: Elsevier Health Sciences; 2013.
10. Holden M, Heather Z, Paillot R, Steward K, Webb K. Genomic Evidence for the Evolution of Streptococcus equi: Host Restriction. 2009.
11. Russell F, Biribo S, Selvaraj G, Oppedisano F, Warren S, Seduadua A, et al. As a bacterial culture medium, citrated sheep blood agar is a practical alternative to citrated human blood agar in laboratories of developing countries. Journal of clinical microbiology. 2006;44(9):3346-51.
12. Mahon CR, Lehman DC. Textbook of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences; 2022.
13. Simner PJ, Hindler JA, Bhowmick T, Das S, Johnson JK, Lubers BV, et al. What's New in Antibiograms? Updating CLSI M39 Guidance with Current Trends. Journal of clinical microbiology. 2022;60(10):e02210-21.
14. Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. Journal of clinical microbiology. 2021;59(12):10.1128/jcm. 00213-21.
15. Alber J, El-Sayed A, Lämmler C, Hassan A, Weiss R, Zschöck M. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus and Streptococcus equi subsp. equi. Journal of Veterinary Medicine, Series B. 2004;51(10):455-8.
16. Noli Truant S, Redolfi DM, Sarratea MB, Malchiodi EL, Fernández MM. Superantigens, a Paradox of the Immune Response. Toxins. 2022;14(11):800.
17. Boyle A, Timoney JF, Newton J, Hines M, Waller A, Buchanan B. Streptococcus equi infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles—revised consensus statement. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2018;32(2):633-47.

assays. Journal of veterinary internal medicine. 2018;32(1):459-64.

18. Baracco GJ. Infections caused by group C and G streptococcus (Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis and others): epidemiological and clinical aspects. Microbiology spectrum. 2019;7(2):7.2. 32.
19. Low DE, Young MR, Harding GK. Group C streptococcal meningitis in an adult. Archives of Internal Medicine. 1980;140(7):977-8.
20. McCormick JK, Pragman AA, Stolpa JC, Leung DY, Schlievert PM. Functional characterization of streptococcal pyrogenic exotoxin J, a novel superantigen. Infection and immunity. 2001;69(3):1381-8.
21. Munz OH, Sela S, Baker BS, Griffiths CE, Powles AV, Fry L. Evidence for the presence of bacteria in the blood of psoriasis patients. Archives of dermatological research. 2010;302:495-8.
22. Harris SR, Robinson C, Steward KF, Webb KS, Paillot R, Parkhill J, et al. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, Streptococcus equi, is driven by persistent infection. Genome Research. 2015;25(9):1360-71.
23. Tscheschlok L, Venner M, Steward K, Böse R, Riihimäki M, Pringle J. Decreased clinical severity of strangles in weanlings associated with restricted seroconversion to optimized Streptococcus equi ssp equi