JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره نهم، شماره اول، ۱۳۹۲، پیاپی ۲۶: ۶۰-۵۱

ارزیابی گروه‌های اختصاصی *agr* در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از حفره بینی گاو، گوسفند و بز با استفاده از مولتیپلکس PCR

حامد سلامی پرگو[۱]، حبیب دستمالچی ساعی[۲*]، ملاحت احمدی[۲]، حیدر رحیمی[۱]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱ اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۷ فروردین ۱۳۹۲

چکیده

تنظیم کننده ژنی فرعی agr (Accessory gene regulator) نوعی سیستم مرکزی است که بیان عوامل حدت استافیلوکوکوس اورئوس را کنترل نموده و چهار گروه آللی (بنام‌های agr I-IV) در این سیستم مشخص شده است. هدف از این مطالعه معین کردن وفور گروه‌های agr مختلف در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بدست آمده از حفره بینی گاو، گوسفند و بزهای سالم می-باشد. در مطالعه حاضر، ۲۶ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس از حفره بینی ۷۹ راس گاو (چهار جدایه)، ۷۸ راس گوسفند (۱۱ جدایه) و ۴۴ راس بز (۱۱ جدایه) بدست آمد. سپس جدایه‌ها با استفاده از روش مولتیپلکس PCR از نظر تیپ agr مورد بررسی قرار گرفتند. با وجود وفور کم استافیلوکوکوس اورئوس در بینی گاو (۵/۰۶٪)، این جرم بطور معمول‌تر از بینی گوسفند (۱۴/۱٪) و بز (۲۵٪) جداسازی شد. از چهار جدایه استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از گاو، سه جدایه به agr گروه I و یک جدایه به agr گروه IV تعلق داشتند. از ۱۱ جدایه حاصل از حفره بینی گوسفند، هفت جدایه متعلق به agr گروه I بودند و چهار جدایه باقی-مانده به agr گروه III (سه جدایه) و agr گروه II (یک جدایه) تعلق داشتند. بیشتر جدایه‌های بدست آمده از حفره بینی بز (۱۰ جدایه) نیز متعلق به agr گروه I بودند و تنها یکی از جدایه‌ها با منشاء بز مربوط به agr گروه II بود. روی هم رفته، شیوع پایین استافیلوکوکوس اورئوس در بینی گاوان در مقایسه با نشخوارکنندگان کوچک یافت شد. همچنین، جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس با agr گروه I معمول بودند که احتمالاً بواسطهٔ تطابق تنظیمی به محیط بینی از قابلیت بالایی جهت استقرار در حفره بینی نشخوارکنندگان برخوردارند. انجام مطالعات بیشتر به منظور تعیین نقش نوع سیستم تنظیمی agr در استقرار باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در حفره بینی لازم و ضروری است.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، agr، بینی، نشخوارکنندگان*

* نویسنده مسئول: حبیب دستمالچی ساعی

آدرس: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. تلفن: ۲۹۷۲۶۶۱-۰۴۴۱

پست الکترونیک: hdsaei561@gmail.com

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس قابلیت کلونیزه شدن در مخاط بینی انسان و دام‌های مختلف را داشته (۳۰) و در سراسر جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین اجرام بیماری-زای ایجاد کننده ورم پستان در نشخوارکنندگان مطرح می‌باشد (۱۵). اگرچه مخزن اصلی *استافیلوکوکوس اورئوس* غدهٔ پستانی عفونی شده می‌باشد، با این حال اهمیت دقیق منابع دیگر مانند بینی ناشناخته است (۲۴). عنوان شده است که در نشخوارکنندگان دستگاه تنفس فوقانی می‌تواند مخزن احتمالی برای آلودگی پستان و شیر در مزارع شیری باشد (۲۸). *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای فاکتورهای زیادی است که در کلونیزاسیون و نیز در انتشار جرم در میزبان و حدت اهمیت دارند. تنظیم‌کننده ژنی فرعی (*agr*) یک مجموعه از ژن‌های موثر در شناخت حد نصاب (Quorum Sensing) می‌باشد که جایگزینی و حدت را در *استافیلوکوکوس اورئوس* کنترل می‌کند. جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس لوکوس *agr* به چهار گروه I، II، III و IV تقسیم می‌شوند (۱۷)، بطوری که جدایه‌های مربوط به یک گروه می‌توانند پاسخ *agr* را در جدایه‌های متعلق به همان گروه فعال نمایند اما فعالیت آن را در اعضاء مربوط به گروه‌های دیگر مهار کنند. وجود چنین مهار متقاطعی در بین جدایه‌ها، شکل نوینی از تداخل باکتریایی را تشکیل می‌دهد (۱۳). این نوع تداخل باکتریایی همچنین می‌تواند در جدال برای کلونیزه شدن محل‌های عفونی موثر باشد (۱۳). همچنین عنوان شده است که گروه‌های اختصاصی *agr* اکولوژی میزبان را از طریق افزایش یا کاهش قابلیت یک جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* جهت کلونیزه شدن (یا رقابت) در حضور سویه‌های ساکن (۱۳)، شامل سایر استافیلوکوک‌ها (۲۲)، تحت تاثیر قرار می‌دهد. این موضوع به انتقال ترجیحی سویه‌هایی با گروه *agr* خاص که در شرایط رقابتی موجود در بدن میزبان موفق هستند، منجر می-گردد.

شواهد نشان می‌دهند که ارتباط مستقیمی بین یک گروه *agr* و یک بیماری خاص ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* در انسان وجود ندارد (۱۲)، اما به نظر می‌رسد که برخی از گروه‌ها ترجیحاً توکسین‌های خاصی تولید می‌کنند، به عنوان مثال اکثر سویه‌های توکسیک شوک قاعدگی متعلق به گروه *agr* نوع III می‌باشند (۱۳) و اکثر سویه‌های مولد اپیدرمولیزین A به گروه *agr* نوع IV تعلق دارند (۱۱). در حالی که سویه‌های ایجاد کنندی ورم پستان گاوی عمدتاً در *agr* گروه I و به میزان کمتری در گروه II و III طبقه بندی شده‌اند (۲۹ و ۵). همچنین مشخص شده است که سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* گاوی متعلق به *agr* گروه I بطور قابل توجهی قابلیت بالایی در داخل شدن به سلول‌های اپیتلیال پستان گاو و باقی ماندن در غدد پستانی موش دارند (۵)، در حالی که سویه‌های *agr* گروه II سطوح خارج سلولی را ترجیح می‌دهند، بنابراین بیشتر با تشکیل بیوفیلم ارتباط دارند (۱۹). به علاوه، پیشنهاد شده است که مقاومت نسبت به پنی‌سیلین در سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به *agr* گروه I معمول‌تر است (۱۹).

از این‌رو به لحاظ اهمیت لوکوس *agr* در تنظیم بیان عوامل حدت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و نقش این لوکوس در تداخل باکتریایی و اختصاصیت برخی از گروه‌های *agr* به مواضع و میزبانان معین، انجام مطالعات جامع در ارتباط با مشخص نمودن گروه‌های *agr* غالب در میزبانان مختلف و نیز در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از منشاهای

متفاوت لازم و ضروری است. از آنجایی‌که هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد تنوع گروه‌های *agr* در بین جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ساکن در حفره بینی نشخوارکنندگان وجود ندارد، از این‌رو انجام چنین تحقیقاتی در زمینه گروه‌های *agr* ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این مطالعه ۲۰۱ نمونه سواب استریل از حفره بینی ۷۹ راس گاو، ۷۸ راس گوسفند و ۴۴ راس بز سالم نگهداری شده در سه منطقه خرم‌آباد، نورآباد و ارومیه تهیه شد. نمونه‌گیری از هر دو مجرای بینی توسط مالیدن سواب آغشته به محیط آبگوشت مغذی به دیواره مجرای بینی و سپس انتقال سواب به محیط آبگوشت مغذی انجام گرفت. سواب‌ها پس از قرار گرفتن در محیط آبگوشت مغذی در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس محیط‌های کشت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. جهت کشت و جداسازی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۰/۱ سی‌سی از هر یک از محیط‌های آبگوشت مغذی در داخل محیط مانیتول سالت آگار کشت داده شدند. محیط‌های کشت داده شده به مدت ۱۸ تا ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه-سانتی‌گراد قرار گرفتند و از نظر رشد پرگنه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت خالص‌سازی از پرگنه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* بر روی محیط آگار خون‌دار به صورت ایزوله کشت تهیه شد. نتایج آزمایشات کاتالاز، کواگولاز، مانیتول، نیترات، شیر تورنسل‌دار، گلوکز، ساکاروز و لاکتوز جهت تایید تشخیص نتیجه رنگ‌آمیزی به روش گرم، مورد بررسی قرار گرفتند. سپس جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB, Merck, Germany) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته باکتریایی در محیط BHI و از کیت استخراج DNA ژنومی استفاده گردید (Fermantas, Germany).

تشخیص مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از تکثیر ژن *nuc*

جهت شناسایی دقیق‌تر جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه بر آزمایشات بیوشیمیایی استاندارد از تکثیر ژن *nuc* با استفاده از پرایمرها و چرخه‌های دمایی ارایه شده توسط Brakstad و همکاران (۱۹۹۲) نیز استفاده گردید (۳).

آزمون مولتیپلکس PCR برای تشخیص گروه‌های اختصاصی *agr*

گروه‌های اختصاصی *agr* بر اساس پرایمرها و چرخه‌های دمایی گزارش شده توسط Gilot و همکاران (۲۰۰۲) مورد تکثیر قرار گرفتند (۹). این واکنش با استفاده از کیت PCR ساخت شرکت سیناژن در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس، پرایمرهای *pan*، *agr*1، *agr*2، *agr*3، *agr*4 هر کدام به مقدار ۰/۴ میکرومولار، ۸/۵ میکرولیتر از آب دیونیزه استریل و ۲ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده انجام گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناژن تهیه شدند و ردیف بازهای آن‌ها و اندازه‌ی محصول PCR حاصل از هر یک در جدول ۱ آمده است. عمل تکثیر در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه؛ ۲۶ چرخه

متشکل از ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه؛ ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه؛ ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و مرحله امتداد نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

نتایج

نتایج تکثیر ژن *nuc* به روش PCR

به منظور تشخیص دقیق‌تر نمونه‌ها علاوه بر تست‌های بیوشیمیایی از تکثیر ژن *nuc* به روش PCR استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق قطعه‌ای به اندازه‌ی ۲۷۹ جفت باز را در تمامی جدایه‌ها تکثیر دادند. شکل ۱ الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر ژن *nuc* بر روی ژل آگاروز را نشان می‌دهد.

در مطالعه حاضر با تکثیر ژن *nuc* از مجموع ۲۰۱ نمونه سواب بینی اخذ شده از نشخوارکنندگان سالم تعداد ۲۶ جدایه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمد. از بین ۷۹ گاو، ۷۸ گوسفند و ۴۴ بز سالم، تعداد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده به ترتیب چهار (۵/۰۶٪)، ۱۱ (۱۴/۱٪) و ۱۱ (۲۵٪) بود (نمودار ۱).

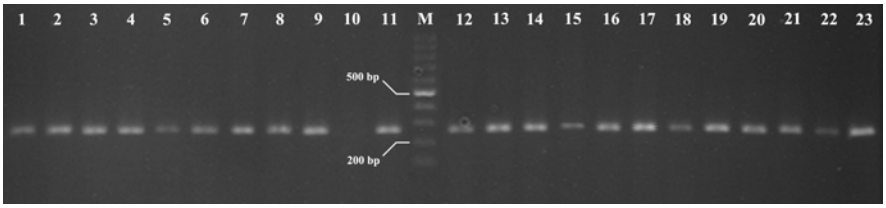
نتایج تکثیرگروه‌های اختصاصی *agr* به روش مولتیپلکس PCR

گروه‌های اختصاصی *agr* در ۲۶ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* (چهار جدایه گاوی، ۱۱ جدایه گوسفندی و ۱۱ جدایه بزی) به روش مولتیپلکس PCR مورد مطالعه قرار گرفت. تکثیر گروه‌های I، II، III و IV مربوط به *agr* به ترتیب فرآورده‌های PCR به اندازه‌ی ۴۴۱، ۵۷۵، ۳۲۳ و ۶۵۹ جفت باز تولید نمودند (شکل ۲).

در مطالعه حاضر، از چهار جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمده از گاو، سه جدایه به گروه I، و یک جدایه به *agr* گروهIV تعلق داشتند. از ۱۱ جدایه حاصل از بینی گوسفند، هفت جدایه متعلق به *agr* گروه I بودند و چهار جدایه باقی‌مانده به *agr* گروه III (سه جدایه) و *agr* گروه II (یک جدایه) تعلق داشتند. بیشتر جدایه‌های بدست آمده از بینی بز (۱۰ جدایه) متعلق به *agr* گروه I بوده و تنها یکی از جدایه‌ها مربوط به گروه II بود (جدول ۲).

جدول ۱- توالی پرایمرهای گروه‌های اختصاصی *agr*.

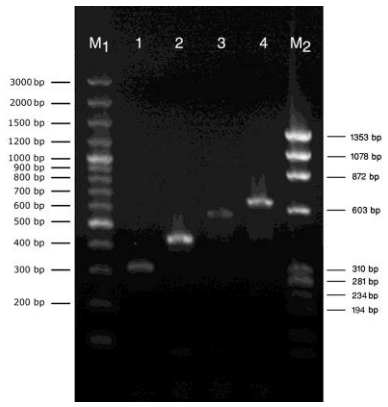
پرایمر	توالی پرایمر	اندازه
pan	5'-ATG CAC ATG GTG CAC ATG C-3'	-
agr1	5'-GTC ACA AGT ACT ATA AGC TGC GAT-3'	۴۴۱ جفت باز
agr2	5'-TAT TAC TAA TTG AAA AGT GGC CAT AGC-3'	۵۷۵ جفت باز
agr3	5'-GTA ATG TAA TAG CTT GTA TAA TAA TAC CCA G-3'	۳۲۳ جفت باز
agr4	5'-CGA TAA TGC CGT AAT ACC CG-3'	۶۵۹ جفت باز



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن *nuc* بر روی ژل آگاروز. چاهک M: مارکر GeneRuler^{TM} 100 bp DNA ladder؛ چاهک ۱۱: کنترل مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213)؛ چاهک ۱۰؛ کنترل منفی؛ چاهک‌های ۹-۱ و ۲۳-۱۲: جدایه‌های منتخب *استافیلوکوکوس اورئوس* با واکنش مثبت *nuc*.

جدول ۲- تعداد نمونه اخذ شده از بینی نشخوارکنندگان سالم و تعداد جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از آن‌ها.

نوع دام	تعداد سواب بینی اخذ شده	تعداد جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده	درصد
گاو	۷۹	۴	۵/۰۶
گوسفند	۷۸	۱۱	۱۴/۱
بز	۴۴	۱۱	۲۵



شکل ۲- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر گروه‌های اختصاصی *agr* بر روی ژل آگاروز. چاهک M_1: مارکر GeneRuler™ 100 bp DNA ladder plus marker؛ چاهک ۱: *agr* گروه III (323 bp)؛ چاهک ۲: *agr* گروه I (441 bp)؛ چاهک ۳: *agr* گروه II (575 bp)؛ چاهک ٤: *agr* گروه IV (659 bp)؛ چاهک M_2: مارکر ΦX174DNA/*BsuRI*(*HaeIII*) marker.

جدول ۳- نتایج تکثیر گروه‌های اختصاصی *agr* به روش مولتیپلکس PCR

نوع دام	گروه‌های *agr*				مجموع
	agr I	*agr II*	*agr III*	*agr* IV	
گاو	۳	–	–	۱	٤
گوسفند	۷	۱	۳	–	۱۱
بز	۱۰	۱	–	–	۱۱

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوس اورئوس ساکن در حفره بینی نشخوارکنندگان به عنوان مخزن احتمالی برای عفونت‌های *استافیلوکوکی* مطرح می‌باشد (۲۸ و ۲۱). لذا در مطالعه حاضر حفره بینی نشخوارکنندگان سالم شامل ۷۹ راس گاو، ۷۸ راس گوسفند و ۴۴ راس بز از نظر حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه قرار گرفته و ویژگی ژنوتیپی جدایه‌های بدست آمده از نقطه نظر تیپ *agr* مورد بررسی قرار گرفت. براساس ویژگی‌های کشت و آزمایشات بیوشیمیایی و نیز آزمایش مولکولی مبتنی بر تکثیر ژن *nuc*، تعداد ۱۱ (۱۴/۱٪)، ۱۱ (۲۵٪) و ۴ (۵/۰۶٪) جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب از حفره بینی گوسفند، بز و گاو بدست آمد. در مطالعه Vautor و همکاران (۲۰۰۵)، Gharsa و همکاران (۲۰۱۲) و Mork و همکاران (۲۰۱۲) که به ترتیب در فرانسه، تونس و نروژ انجام گرفتند میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از حفره بینی گوسفندان سالم به ترتیب ۲۹٪، ۴۴/۸٪ و ۷۱/۵٪ گزارش گردید (۲۸ و ۲۰، ۸). در مطالعات انجام گرفته بر روی بزهای سالم این میزان ۱۷/۶٪ در اتیوپی و ۶۸/۹٪ در نروژ گزارش شده است (۲۱ و ۱۸). در حالی‌که مطالعات مختلف نشان دهنده وفور کم این باکتری در حفره بینی گاوان می - باشند. به طوری‌که در یک مطالعه از ۱۲۲ نمونه سواب

بینی اخذ شده از گاوان سالم، ۱۷ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۳/۹٪) بدست آمد (۲۰). از سوی دیگر، در دو مطالعه‌ای که در نروژ توسط Jorgensen و همکاران (۲۰۰۵) و در بریتانیا توسط Smith و همکاران (۲۰۰۵) انجام گرفت، با وجود فراوانی بالای *استافیلوکوکوس اورئوس* در موارد تورم پستان گاو، در نمونه‌های سواب بینی جدایه‌ای یافت نشد (۱۴، ۲۵). بطور کلی در مطالعه حاضر میزان حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در حفره بینی گاو در مقایسه با گوسفند و بز کمتر بود که این موضوع با نتایج حاصل از مطالعات دیگر مبنی بر شیوع بالای *استافیلوکوکوس اورئوس* در حفره بینی نشخوارکنندگان کوچک در مقایسه با گاو هم‌خوانی دارد (۲۱ و ۲۰، ۸). لذا تصور می‌شود که حفره بینی نشخوارکنندگان کوچک می‌تواند مخزن مهمی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد. با این حال در مطالعه Alzohairy و همکاران (۲۰۱۱) که در عربستان انجام گرفت، از مجموع ۴۰۰ نمونه سواب بینی حاصل از دام‌های سالم شامل شتر، گوسفند، گاو و بز (هرکدام ۱۰۰ نمونه)، ۱۵۸ (۴۳/۸٪) جدایه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمد که تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از شتر، گوسفند، گاو و بز به ترتیب ۵۴ (۵۴٪)، ۳۸ (۳۸٪)، ۳۶ (۳۶٪) و ۳۰ (۳۰٪) جدایه بود (۱).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، *agr* تیپ I وفور بالایی داشته و به نظر می‌رسد که از سازگاری بالایی به بینی نشخوارکنندگان برخوردار است. مطالعات بر روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از حفره بینی انسان نیز نشان‌دهندهٔ فراوانی بالای *agr* تیپ I در مقایسه با سایر تیپ‌های *agr* می‌باشد (۱۶ و ۶). Peerayeh و همکاران (۲۰۰۹) نیز در ایران فراوانی گروه‌های *agr* را در ۳۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از بینی افراد سالم بررسی نموده و *agr* تیپ I در ۵۰٪ از جدایه‌های مورد مطالعه شناسایی گردید (۲۳). از این‌رو به نظر می‌رسد که نوعی سازگاری تنظیمی بواسطهٔ سیستم *agr* در جایگزینی *استافیلوکوکوس اورئوس* در مخاط بینی انسان و دام‌ها موثر است. نقش سازگاری تنظیمی در جایگزینی این باکتری در حفره بینی قبلاً مطرح گردیده است و عنوان شده است که تنظیم‌کننده اصلی در بیان تطابقی ژن‌ها در حفره بینی، سیستم *WalKR* می‌باشد (۴). با این حال در مطالعه‌ای که بر روی ۲۴ جدایه بدست آمده از حفره بینی اسب انجام گرفت، *agr* تیپ I، II، III و IV به ترتیب در ۲، ۱، ۱۰ و ۱۱ جدایه شناسایی گردید (دستمالچی ساعی و همکاران، اطلاعات منتشر نشده) که نشان‌دهندهٔ احتمال وجود نوعی اختلاف در پراکندگی گروه‌های *agr* در حفره بینی اسبان در مقایسه با انسان و نشخوارکنندگان است. این موضوع می‌تواند ناشی از عوامل در ارتباط با میزبان مثل پاسخ‌های ایمنی، رفتار و/یا آنتاگونیسم بین اعضاء فلور طبیعی باشد. به عنوان مثال مطالعات نشان داده‌اند که گونه‌های *کورینه باکتریوم* اختصاصاً از جایگزینی *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت می‌نمایند (۲۷ و ۱۶). همچنین برای کلونیزاسیون موفق، یک سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* باید با سایر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* رقابت نماید. چنین تداخلات بین سویه‌ای در *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند ناشی از پلی‌مورفیسم در سیستم تنظیم‌کننده *agr* باشد. Barbagelata و همکاران (۲۰۱۱) عنوان نموده‌اند که AIP تولید شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* تخفیف حدت یافته از نظر فنوتیپ *aroA* (NK41) که به گروه I مربوط به *agr* تعلق دارد (AIP_1)، از فعال

شدن سیستم *agr* مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* متعلق به گروه‌های دیگر *agr* ممانعت نموده و از این‌رو بیان ژن‌های مختلف موثر در جایگزینی در حفره بینی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲). با این حال نقش این سیستم در حالت حاملی *استافیلوکوکوس اورئوس* در بینی بطور کامل روشن نیست (۷).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه *agr* تیپ IV تنها در جدایه‌های گاوی شناسایی گردید در حالی‌که تیپ مذکور در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از گوسفند و بز وجود نداشت. این موضوع نشان‌دهنده احتمال وجود نوعی اختلاف در تیپ *agr* جدایه‌های گاوی و نشخوارکنندگان کوچک است. در مطالعه Gharsa و همکاران (۲۰۱۱) نیز که در تونس انجام گرفت از ۷۳ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از حفره بینی گوسفند، *agr* تیپ IV مشاهده نشد (۸).

نکته قابل توجه اینکه مطالعات متعدد انجام شده بر روی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* بدست آمده از موارد تورم پستان نشخوارکنندگان نشان داده‌اند که جدایه‌های متعلق به گروه I مربوط به *agr* از شیوع فراوانی برخوردارند (۲۶ و ۱۰، ۵). فراوانی جدایه‌های متعلق به *agr* گروه I در ارتباط با تورم پستان و حفره بینی می‌تواند نشان‌دهندهٔ اهمیت حالت حاملی *استافیلوکوکوس اورئوس* در حفره بینی و ارتباط آن با بروز تورم پستان می‌باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که حفره بینی گوسفندان سالم مخزن مهمی برای آلودگی بافت پستان و شیر در گله‌های شیری بوده که این موضوع از نقطه نظر بهداشت عمومی نیز حایز اهمیت است (۲۸ و ۸).

بطور خلاصه بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد حالت حاملی *استافیلوکوکوس اورئوس* در حفره بینی نشخوارکنندگان کوچک در مقایسه با گاو بیشتر باشد. همچنین تصور می‌شود جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* متعلق به گروه I مربوط به *agr* از قابلیت سازش بالایی به حفره بینی نشخوارکنندگان برخوردارند که‌این موضوع نشان‌دهندهٔ نقش سازش تنظیمی در جایگزینی باکتری در حفره‌بینی می‌باشد. با این حال قابلیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در جایگزینی در حفره بینی ناشی از مجموعه پیچیده‌ای از برهم‌کنش‌های میکروب-میزبان و میکروب-میکروب بوده و با توجه به محدود بودن تعداد جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد مطالعه در این تحقیق انجام تحقیقات جامع در این زمینه و با تعداد نمونه بیشتر لازم و ضروری است.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که هزینه تحقیق را فرآهم نمودند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Alzohairy, M. (2011). Colonization and antibiotic susceptibility pattern of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) among farm animals in Saudi Arabia. *Journal of Bacteriology Research* **3**: 63-8.

2. Barbagelata, M.S., Alvarez, L., Gordiola, M., Tuchscherr, L., von Eiff, C., Becker, K., Sordelli, D., Buzzola, F. (2011). Auxotrophic mutant of *Staphylococcus aureus* interferes with nasal colonization by the wild type. *Microbes and Infection / Institute Pasteur* **13**: 1081-90.

3. Brakstad, O.G., Aasbakk, K., Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction

11. Jarraud, S., Lyon, G.J., Figueiredo, A.M., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., Muir, T.W., Novick, R.P. (2000). Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **182**: 6517-22.
12. Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. *Infection and Immunity* **70**:631-41.
13. Ji, G., Beavis, R., Novick, R.P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.
14. Jorgensen, H.J., Mork, T., Rorvik, L.M. (2005). The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *Journal of Dairy Science* **88**: 3810-7.
15. Le Marechal, C., Seyffert, N., Jardin, J., Hernandez, D., Jan, G., Rault, L., Azevedo, V., Francois, P., Schrenzel, J., van de Guchte, M., Even, S., Berkova, N., Thiery, R., Fitzgerald, J.R., Vautor, E., Le Loir, Y. (2011). Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One* **6**: e27354.
16. Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F. (2003). Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of Staphylococcal *agr* alleles. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 18-23.
17. Mayville, P., Ji, G., Beavis, R., Yang, H., Goger, M., Novick, R.P., Muir, T.W. (1999). Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 1218-23.
18. Megra, T., Sisay, T., Asseged, B. (2006). The aerobic bacterial flora of the respiratory passage ways of healthy goats in dire Dawa abattoir, Eastern Ethiopia. *Revue de Medecine Veterinaire* **157**: 84-7.
amplification of the *nuc* gene. *Journal of Clinical Microbiology* **30**: 1654-60.
4. Burian, M., Wolz, C., Goerke, C. (2010). Regulatory adaptation of *Staphylococcus aureus* during nasal colonization of humans. *PloS One* **5**: e10040.
5. Buzzola, F.R., Alvarez, L.P., Tuchscherr, L.P., Barbagelata, M.S., Lattar, S.M., Calvinho, L., Sordelli, D.O. (2007). Differential abilities of capsulated and noncapsulated *Staphylococcus aureus* isolates from diverse *agr* groups to invade mammary epithelial cells. *Infection and Immunity* **75**: 886-91.
6. Cespedes, C., Said-Salim, B., Miller, M., Lo, S.H., Kreiswirth, B.N., Gordon, R.J., Vavagiakis, P., Klein, R.S., Lowy, F.D. (2005). The clonality of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *The Journal of Infectious Diseases* **191**:444-52.
7. Fleming, V., Feil, E., Sewell, A.K., Day, N., Buckling, A., Massey, R.C. (2006). Agr Interference between Clinical *Staphylococcus aureus* Strains in an Insect Model of Virulence. *Journal of Bacteriology* **188**: 7686-8.
8. Gharsa, H., Ben Slama, K., Lozano, C., Gomez-Sanz, E., Klibi, N., Ben Sallem, R., Gomez, P., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C. (2012). Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of *Staphylococcus aureus* in healthy sheep in Tunisia. *Veterinary Microbiology* **156**: 367-73.
9. Gilot, P., Lina, G., Cochard, T., 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**: 4060-7.
10. Gilot, P., Van Leeuwen, W. (2004). Comparative analysis of *agr* locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 1265-9.

19. Melchior, M.B., van Osch, M.H,. Graat, R.M., van Duijkeren, E., Mevius, D.J., Nielen, M., Gaastra, W., Fink-Gremmels, J. (2009). Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in agr-type II strains. *Veterinary Microbiology* **137**: 83-9.

20. Mork, T., Kvitle, B., Jorgensen, H.J. (2012). Reservoirs of *Staphylococcus aureus* in meat sheep and dairy cattle. *Veterinary Microbiology* **155**: 81-7.

21. Mork, T., Kvitle, B., Mathisen, T., Jorgensen, H.J. (2010). Bacteriological and molecular investigations of *Staphylococcus aureus* in dairy goats. *Veterinary Microbiology* **141**: 134-41.

22. Otto, M. (2004). Quorum-sensing control in Staphylococci – a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiology Letters* **241**: 135-41.

23. Peerayeh, S.N., Azimian, A., Behzadian Nejad, Q., Kashi, M. (2009). Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* isolates from University hospitals in Tehran. *Labmedicine* **40:** 27-9.

24. Roberson, J.R., Fox, L.K., Hancock, D.D., Gay, J.M., Besser, T.E. (1998). Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *Journal of Dairy Science* **81**: 687-93.

25. Smith, E.M., Green, L. E., Medley, G.F., Bird, H.E., Dowson ,C.G. (2005). Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolated from high-somatic-cell-count cows and the environment of an organic dairy farm in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4731-6.

26. Smyth, D.S., Feil, E.J,. Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Tollersrud, T., Fitzgerald, J.R., Enright, M.C., Smyth, C.J. (2009). Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology* **58:** 1343-53.

27. Uehara, Y., Nakama, H., Agematsu, K., Uchida, M., Kawakami, Y., Abdul Fattah, A.S. M., Maruchi, N. (2000). Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *Journal of Hospital Infection* **44**: 127-33.

28. Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J. M., Chevalier, N., Pepin, M. (2005). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. *Veterinary Microbiology* **106**: 235-9.

29. Vautor, E., Magnone, V., Rios, G., Le Brigand, K., Bergonier, D., Lina, G., Meugnier, H., Barbry, P., Thiery, R., Pepin, M. (2009). Genetic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminant species: a single-dye DNA microarray approach. *Veterinary Microbiology* **133**: 105-14.

30.Weese, J. S., Van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* **140**: 418-29.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 9, Issue 1, 2013

Investigation into *agr* Specificity Groups among Nasal Isolates of *Staphylococcus aureus* from Cattle, Sheep and Goats Using Multiplex PCR

Salami Pargoo, H.[1], Dastmalchi Saei, H.[2*], Ahmadi, M.[2], Rahimi, H.[1]

1- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2- Graduated of MSc of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received Date: 19 Feb 2013 Accepted Date: 16 April 2013

Abstract

The accessory gene regulator (agr) is a central system that controls the expression of Staphylococcus aureus virulence factors and four allelic groups (designated as agr I-IV) have been identified in this system. The aim of this study was to ascertain the frequency of the different agr groups in S. aureus isolates recovered from the nasal cavity of healthy cattle, sheep, and goats. In the current study, 26 S. aureus isolates were recovered from the nasal cavity of 79 cattle (n = 4), 78 sheep (n = 11), and 44 goats (n = 11). Then, the isolates were agr typed by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). Despite the low prevalence of S.aureus in the nose of cattle (5.06%), this organism is more commonly isolated from the nose of sheep (14.1%) and goats (25%). Of 4 S. aureus isolates obtained from cattle, 3 were ascribed to agr type I and 1 to agr type IV. Seven out of 11 sheep nasal isolates were of agr type I, the other 4 being agr type III (n=3) and agr type II (n=1). Goat nasal isolates were distributed mainly across agr types I (n=10). Only one of the goat isolates was of agr type II. Overall, a low prevalence of S. aureus were found in the nose of cattle compared to small ruminants. Also, S. aureus isolates with agr type I were common and might be capable of colonizing the nasal cavity of ruminants, most likely by regulatory adaptation to the nose environment. Further studies will be necessary to define how the type of agr regulatory system might affect S. aureus nasal colonization.

Keywords: *Staphylococcus aureus, agr, Nasal, Ruminants*

**Corresponding author: Dastmalchi Saei, H.*
Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Tel:0441-2972661
Email: hdsaei561@gmail.com