مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۱، ۱۴۰۱، ۵۴-۴۷
مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی ملکولی *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پیوژنز* از آبسه‌های جلدی گاو در تعدادی از گاوداری‌های شیری اطراف تهران

خاطره کفشدوزان[۱]، ایرج اشرافی‌تمای[۲]، جمیل عطایی[۲]، تقی زهرایی‌صالحی[۲]

[۱] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران*
[۲] *گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۳ بهمن ماه ۱۴۰۰، **تاریخ پذیرش:** ۲۵ اسفند ماه ۱۴۰۰

10.22059/jvr.2021.297020.3021 20.1001.1.20082525.1401.77.1.6.1

چکیده

زمینهٔ مطالعه: *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پیوژنز* دو عامل چرکزای مهم در صنعت دامداری ایران و سایر کشورهای جهان می‌باشند که سالانه خسارات اقتصادی فراوانی ایجاد می‌کنند. در حال حاضر مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به این باکتری‌ها در حال افزایش است. تشخیص به موقع آلودگی با این باکتری‌ها نقش مهمی در کنترل عفونت‌های ناشی از این دو باکتری دارد.

هدف: بررسی آلودگی گاوهای مبتلا به آبسه‌های جلدی پنج گاوداری بزرگ اطراف شهر تهران به *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پایوژنز* و همچنین معرفی یک روش پیشنهادی دقیق در تشخیص سریع این دو باکتری.

روش‌کار: از تعداد ۶۰ رأس گاو درگیر با آبسه‌های جلدی در تابستان ۱۳۹۷ جهت تشخیص عامل باکتریایی مولد آبسه، نمونه‌گیری به صورت استریل صورت گرفت و نمونه‌ها در اسرع وقت در مجاورت یخ به آزمایشگاه ارسال شدند. بررسی باکتری شناسی نمونه‌ها با استفاده از واکنش‌های استاندارد بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد.

نتایج: از ۶۰ نمونه مورد بررسی ۲۵ درصد (۱۵/۶۰) به عنوان *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و ۲۰ درصد (۱۲/۶۰) به عنوان *تروپرلا پیوژنز* به صورت خالص جداسازی گردید. در ۵۵ درصد از نمونه‌ها (۳۳/۶۰) نیز هر دو باکتری به صورت همزمان حضور داشتند. کلیه نمونه‌هایی که با استفاده از واکنش‌های بیوشیمیایی تشخیص داده شدند، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد تأیید قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری نهایی: *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پیوژنز* از عوامل اصلی ایجاد آبسه جلدی در گاوداری‌های اطراف شهر تهران می‌باشند. با توجه به این‌که تشخیص دقیق عامل ایجاد آبسه در درمان مؤثر بسیار اهمیت دارد، استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر مبنای دو ژن *16S-23S rDNA* و ژن *16S rRNA* می‌تواند به منظور تشخیص سریع و دقیق این باکتری‌ها در ابتدای بیماری مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: آبسه، شناسایی ملکولی، عفونت هم زمان، *تروپرلا پیوژنز*، *کورینه باکتریوم پزودوتوبرکلوزیس*

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: خاطره کفشدوزان، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
پست الکترونیکی: kafshdouzan@semnan.ac.ir

مقدمه

آبسه‌های جلدی در گاوها توسط عوامل چرکزای مختلفی ایجاد می‌شوند. این آبسه‌ها، علاوه بر افت کیفیت پوست و کاهش بازده گله، باعث انتشار باکتری، افزایش بروز آبسه‌های احشایی، افزایش موارد ورم پستان و متریت در سطح گله نیز می‌شوند. دو عامل اصلی ایجاد کننده این عارضه، *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پیوژنز* می‌باشند (۱). *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس*، کوکوباسیل گرم مثبت و پاتوژن داخل سلولی اختیاری بوده که قادر است در فاگوسیت‌ها زنده بماند. این باکتری همچنین عامل بیماری لنفادنیت کازئوز در گوسفند و بز و لنفانژیت اولسراتیو در گاو و اسب می‌باشد (۲). بیماریزایی این باکتری با تولید نوعی

اگزوتوکسین بنام فسفولیپاز D در ارتباط است. این آنزیم از طریق هیدرولیز اسفنگومیلین غشاء سلول‌های پستانداران موجب تولید کولین می‌شود. کولین قدرت بقا و تکثیر باکتری را در مراحل اولیه ورود به بدن افزایش می‌دهد. همچنین وجود نوعی لیپید به نام اسید مایکولیک در دیواره این باکتری و جلوگیری از فاگوسیتوز، تحریک سیستم ایمنی میزبان و ایجاد آبسه، در بیماریزایی این باکتری نقش دارد (۳). آلودگی به این جرم باعث عفونت‌های تب‌زا و ایجاد آبسه و چرک در سیستم لنفاوی بسیاری از گاوها می‌شود (۲). هر چند بیوتیپ‌های نیترات مثبت این باکتری، از گاو، اسب و شتر جداسازی می‌شوند ولی در مواردی بیوتیپ‌های نیترات منفی نیز ایجاد عفونت می‌کنند. بیوتیپ‌های نیترات منفی در گوسفند، بز و گوزن بیماریزا هستند (۴،۵،۶).

تروپرلا پیوژنز متعلق به خانواده *اکتینومیستاسه*، پیش از این به نام *آرکانوباکتریوم پیوژنز* و *اکتینومایست پایوژنز* نامیده می‌شد. این باکتری گرم مثبت، کوکوباسیل نامنظم، غیر متحرک، بدون اسپور و بیهوازی اختیاری است که به شکل کومنسال در پوست، غشاء مخاطی قسمت فوقانی دستگاه تنفسی، دستگاه ادراری-تناسلی و دستگاه گوارش دیده می‌شود (۷). *تروپرلا پیوژنز* به عنوان یک پاتوژن ثانویه در طیف وسیعی از نشخوارکنندگان اهلی و وحشی مطرح می‌باشد و مسئول خسارات اقتصادی مستقیم ناشی از حذف گاو از گله و یا حذف لاشه و ضبط اندام‌های مختلف خصوصاً کبد و ریه قلمداد می‌شود. این باکتری به عنوان یک عامل بیماریزای فرصت‌طلب محسوب شده و مانند سایر اکتینومیست‌های شناخته شده نظیر *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* و *رودوکوکوس اکویی* عامل ایجاد عفونت‌های چرکی رایج مانند ورم پستان، متریت و آبسه‌های جلدی است (۳،۸). اگرچه مدت زمان زیادی از شناسایی این باکتری می‌گذرد، هنوز اطلاعات ما در مورد پاتوژنز، راه‌های انتقال و مخازن این باکتری کافی نیست. گفته می‌شود *تروپرلا پیوژنز* از راه خراش، زخم و گزش حشرات وارد بدن دام شده و می‌تواند باعث آبسه‌های داخلی یا زیر جلدی شود (۱). این باکتری در گونه‌های مختلف حیوانات بیماریزا بوده و باعث ضایعات نکروتیک و چرکی در بافت‌های مختلف میزبان می‌شود. به علت تشخیص نادرست و یا درمان نامناسب عفونت ناشی از این باکتری ممکن است شدید و به همراه میزان مرگ و میر متفاوت باشد. بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها و ماکرولیدها اغلب برای درمان عفونت ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به این‌که به واسطه استفاده معمول این داروها در درمان سایر عفونت‌های باکتریایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است، تأثیر این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان آبسه‌های ناشی از تروپرلا بسیار اهمیت دارد. تشخیص نادرست عامل ایجاد بیماری و یا درمان نامناسب عفونت‌های ناشی از این باکتری، ممکن است منجر به افزایش شدت عفونت و درگیری سایر دام‌ها به این باکتری شود (۹). درمان آبسه‌های جلدی و زیرجلدی معمولاً بدون تشخیص دقیق و جداسازی عوامل ایجاد ضایعه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف انجام می‌شود. با توجه به افزایش فراوانی این باکتری‌ها، تشخیص به موقع عفونت ناشی از این باکتری‌ها در انتخاب داروی مناسب، کنترل عفونت و جلوگیری از انتشار آن اهمیت بسیار زیادی دارد. به همین خاطر هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی حضور دو باکتری مهم *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پیوژنز* به عنوان عوامل اصلی ایجاد آبسه جلدی و معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *16S-23S rDNA* و ژن 16S rRNA به عنوان یک روش تشخیص دقیق و حساس در شناسایی این دو باکتری تعیین گردید.

مواد و روش‌کار

نمونه گیری: برای انجام مطالعه حاضر، از ۶۰ راس گاو مبتلا به آبسه جلدی، متعلق به پنج گاوداری که ابتلا به آبسه به صورت مکرر در آن‌ها گزارش گردیده بود، در تابستان سال ۱۳۹۷ نمونه‌گیری به عمل آمد. نمونه‌ها از آبسه‌های تازه، با استفاده از سرنگ استریل اخذ گردید. نمونه‌های اخذ شده با حفظ زنجیره سرمایی، جهت جداسازی و شناسایی عامل بیماریزا، به آزمایشگاه ارسال شدند.

کشت و جداسازی: ابتدا از نمونه‌های انتقال یافته به آزمایشگاه گسترش میکروبی تهیه و با روش گرم رنگ‌آمیزی صورت گرفت. سپس نمونه‌ها به صورت خطی در محیط‌های ژلوز خوندار و مک‌کانکی، کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی و خالص سازی پرگنه‌های مشکوک، از آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تأیید باکتری‌های مورد نظر استفاده شد (جدول ۱).

استخراج DNA و آزمون PCR: جدایه‌های تأیید شده به روش بیوشیمیایی، در محیط تریپتون کازئین سوی براث همراه با ۵ درصد سرم جنین گاوی کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس ۳ میلی لیتر از محیط حاوی باکتری رشد یافته سانتریفیوژ شد. پس از شستشوی پلت باقی‌مانده با سرم فیزیولوژی، از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت (شرکت سیناکلون) برای استخراج DNA استفاده گردید (۹). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از شرکت ویراژن (آمپلیکون، دانمارک Cat. No. PCR- 106S-CSTM) مسترمیکس به‌صورت آماده خریداری شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، با استفاده از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر، آماده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده و مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول ۲ نشان داده شده است. آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی و سویه‌های مثبت *تروپرلا پیوژنز* و *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* تهیه شده از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسیکلر TC- 512 (Techne- England) انجام شد. محصول به دست آمده درژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۹۰ به مدت ۷۰ دقیقه در بافر TBE 1X الکتروفورز گردید. از مارکر ۱۰۰ جفت باز (سیناکلون (PR901644) Cat. No. SL7031) جهت تأیید اندازه باندهای حاصل، استفاده شد. رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (MR7721C) با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر صورت گرفت و تصویر حاصل در دستگاه ترانس ایلومیناتور (Bio-Rad - Germany) مشاهده و ذخیره گردید.

نتایج

نتایج آزمون‌های باکتری‌شناسی: هیچ یک از باکتری‌ها در محیط مک‌کانکی رشد نکردند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ نشان داده شده است. از ۶۰ نمونه مورد بررسی، در ۱۵ نمونه (۲۵ درصد) *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و ۱۲ نمونه (۲۰ درصد) هم *تروپرلا پیوژنز* به صورت خالص جداسازی گردید. در ۳۳ نمونه دیگر (۵۵ درصد)، مخلوطی از دو باکتری مشاهده شد. تصویر مربوط به گسترش مستقیم نمونه‌های واجد تروپرلا و منظره رشد آن در محیط ژلوز خوندار بعد از گذشت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در تصویر ۱ نشان داده شده است.

نتایج آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز: همه نمونه‌هایی که با استفاده از واکنش‌های بیوشیمیایی به عنوان *تروپرلا پیوژنز* و *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* تشخیص داده شدند، به ترتیب واجد قطعه‌ای به وزن مولکولی ۱۲۲ و ۸۱۶ جفت باز بودند. نمونه‌های کنترل مثبت دو باکتری، حاوی باندهای مورد نظر بود و در نمونه کنترل منفی هیچ باندی مشاهده نشد (تصویر ۱،۲).

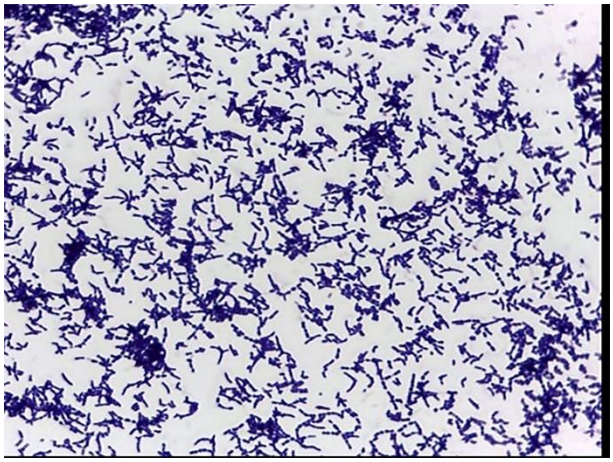
جدول ۱. نتایج برخی از آزمایشات بیوشیمیایی باکتری‌های *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پیوژنز* (۳).

آزمایشات بیوشیمیایی	*کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس*	*تروپرلا پیوژنز*
حرکت	–	–
کاتالاز	+	–
تست CAMP	+ (*ردوکوکوس اکوئی*)	+ (*استافیلوکوکوس اورئوس*)
اوره از	+	–
شیر تورنسله	–	+
ژلاتین	-	+
احیاء نیترات	+	–
سرم لوفلر	–	+

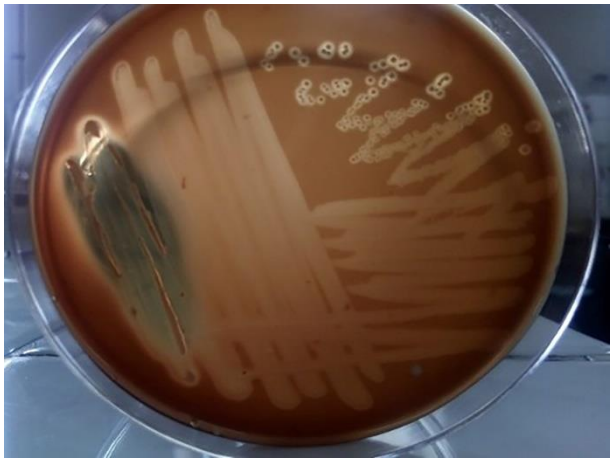
جدول ۲. برنامه زمانی و دمایی پرایمرهای مورد استفاده.

منابع	توالی	ژن هدف	نام پرایمر
۹	F: GTTTTGCTTGTGATCGTGGTGGTTATGA R: AAGCAGGCCCACGCGCAGG	16S-23SrDNA	Tru[1]
۲	F: CCGCACTTTAGTGTGTGTG R: TCTCTACGCCGATCTTGTAT	16S rRNA	Cor[2]

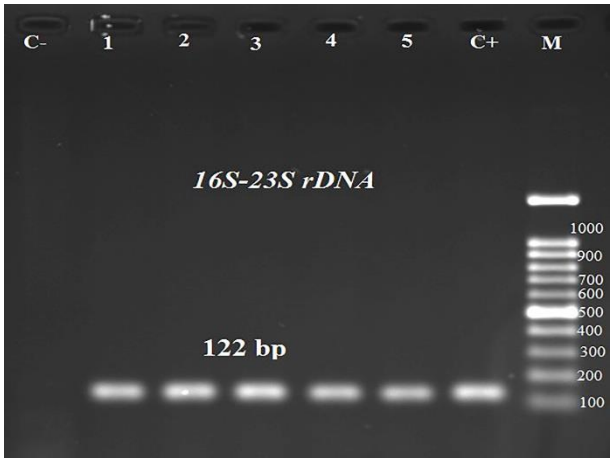
[1] 95°C (10m); 30 cycles; 95°C (60s); 62°C (60s); 72°C (60s); 72°C (7m)
[2] 94°C (5m); 30 cycles; 94°C (60s); 56°C (60s); 72°C (2m); 72°C (2m)



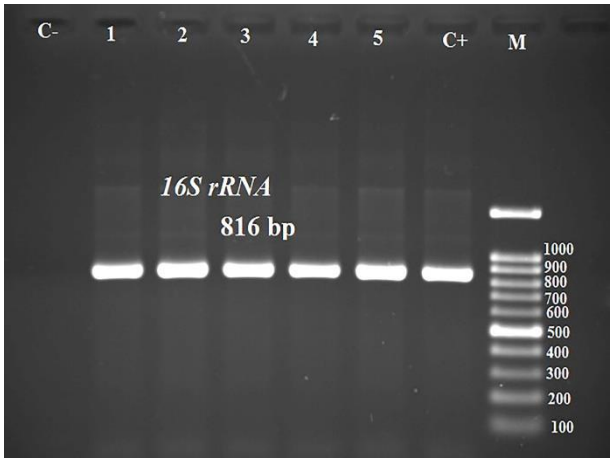
تصویر ۱. باکتری‌های گرم مثبت کوکوباسیلی با اشکال مختلف (پلی مورف).



تصویر ۲. منظره رشد تروپرلا پیوژنز در محیط ژلوز خوندار. همولیز کامل قابل مشاهده است.



تصویر ۳. نتایج الکتروفورز برای شناسایی ژن 16S- 23S rDNA در *تروپرلا پیوژنز*. چاهک اول: کنترل منفی، چاهک ۱ تا ۵: جدایه‌های *تروپرلا پیوژنز*، گوده ۶: کنترل مثبت، چاهک M: مارکر 100bp.



تصویر ۴. نتایج الکتروفورز برای شناسایی ژن 16S rRNA *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس*. چاهک اول: کنترل منفی، چاهک ۱ تا ۵: جدایه‌های *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس*، چاهک ۶: کنترل مثبت، چاهک M: مارکر 100bp.

بحث

براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، نمونه‌های جدا شده از آبسه‌های جلدی گاوهای مورد بررسی، به ترتیب واجد ۲۰ و ۲۵ درصد *تروپرلا پیوژنز* و *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* بودند. همچنین در ۵۵ درصد موارد نیز حضور هردو باکتری به صورت هم‌زمان به اثبات رسید. بنابراین مطالعه حاضر، نشان می‌دهد کورینه *باکتریوم پزودوتوبرکلوزیس* و *تروپرلا پیوژنز*، به عنوان عوامل اولیه و ثانویه در ایجاد آبسه‌های جلدی، در گاوداری‌های اطراف شهر تهران مطرح بوده و همکاری این دو باکتری در ایجاد عفونت‌های همزمان، موجب شدت عفونت، عود بیماری پس از درمان و مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌گردد (۳). این دو باکتری، معمولاً بخشی از فلور پوست و مخاطات بوده و تغییر در شرایط زیستی و میزبانی، موجب عفونت‌های فرصت‌طلب می‌شود. آسیب‌های فیزیکی، تروما، رطوبت، استرس و ضعف مدیریت در دامداری از عوامل مستعد کننده در ایجاد آبسه‌های جلدی است (۳،۱۰). همچنین قدرت بقا این دو باکتری در خاک، پتانسیل ایجاد بیماری را افزایش می‌دهد به‌طوری که به این بیماری، بیماری برخواسته از خاک نیز می‌گویند (۳،۱۱،۱۲). گفته می‌شود باز شدن آبسه‌ها به طور طبیعی یا در حین درمان و یا ریختن شیر آلوده در خاک، ایجاد عفونت در سطح گله را افزایش می‌دهد (۱۳،۱۴). به‌طوری که حتی اپیدمی‌های ناشی از *کورینه باکتریوم پزودوتوبرکلوزیس* در گله‌های گاو نیز گزارش شده است (۱۲). این دو باکتری عمدتاً

از طریق پوست و غشاء مخاطات نفوذ می‌کنند و تماس مستقیم با اگزودای چرکی و پارگی آبسه‌های خارجی موجب انتشار بیماری می‌گردد (۲). از عوامل مهم دیگر در انتشار این دو باکتری حشراتی نظیر مگس و زنبورها می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد این اجرام می‌توانند به مدت چند روز در معده این حشرات زنده بمانند. بنابراین کنترل حشرات به خصوص در فصول بهار و تابستان در کنترل بیماری اهمیت دارد (۱۵). در مطالعه‌ای در هلند نشان داده شده که در حیواناتی که روی خاک‌های شنی زندگی می‌کنند، فراوانی آبسه و ورم پستان بسیار زیاد است. در حالی‌که بروز این دو عارضه در حیواناتی که روی خاک‌های حاوی کود گیاهی پرورش یافتند، کمتر رخ داده و در حیواناتی که روی خاک‌های رسی زندگی می‌کنند هرگز دیده نشد (۱۶). فراوانی آبسه‌ها در نواحی از بدن که دائماً در معرض آسیب‌های فیزیکی هستند بیشتر است (۱۷).

ضربه‌های فیزیکی، جراحات شیمیایی یا میکروبی در پوست و مخاطات، باعث نفوذ این دو باکتری به لایه‌های عمیق‌تر می‌شوند (۱۸،۱۹). مطالعات نشان داده که جدایه‌های به‌دست‌آمده از آبسه‌های کبدی مشابه جدایه‌های دیواره شکمبه هستند (۲۰). این نتایج بر این امر دلالت دارند که جمعیت‌های پوستی و مخاطی این دو باکتری تحت شرایط مناسب می‌توانند موجب عفونت در سایر قسمت‌های بدن شوند (۲۱).

همکاری *تروپرلا پیوژنز* در ایجاد عفونت همزمان با برخی از باکتری‌های پاتوژن مانند *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس*، *اشریشیاکلی*، *فوزوباکتریوم نکروفوروم* همواره مورد توجه محققین بوده است (۲۲). در مطالعه حاضر نیز این عفونت همزمان در ۵۵ درصد از موارد مورد مطالعه مشاهده شد. حضور عوامل حدتی نظیر ژن‌های اتصالی مهم موجب کلونیزه شدن *تروپرلا پیوژنز* در اندام‌های مختلف شده و شدت بیماری را افزایش می‌دهد. همچنین با ایجاد چرک فراوان در محل کلونیزه، باعث جلوگیری از فاگوسیته شدن باکتری‌ها، عدم دسترسی آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش بقاء و ماندگاری باکتری در بدن می‌گردد (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط Ashrafi و همکاران در سال ۲۰۱۸ به منظور مطالعه ژنوتیپی *تروپرلا پیوژنز* جدا شده از موارد متریت و سقط جنین در ایران صورت گرفت، به همکاری *تروپرلا پیوژنز* با باکتری‌های چرکزای دیگر مانند *اشریشیا کلی* و *فوزوباکتریوم نکروفوروم* در ایجاد متریت اشاره شده است (۹). در مطالعه‌ای مشابه، عفونت همزمان *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در ایجاد آبسه‌های جلدی گزارش شده است (۱۷).

اگرچه مطالعات آزمایشگاهی حساسیت برخی از جدایه‌ها را در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به اثبات رسانده است، اما ایجاد کانون‌های چرکی و گرانولوماتوز توسط این باکتری، موجب عدم نفوذ آنتی‌بیوتیک به درون این کانون‌ها شده و درمان را در مراحل پیشرفته با مشکل مواجه می‌کند (۳). Bazargani و همکاران در سال ۲۰۱۳، گزارش کردند که درمان آبسه‌های ناشی از *کورینه باکتریوم پزودوتوبرکلوزیس*، تنها باعث بهبودی ۳۳ درصد از دام‌های آلوده شده است. در مطالعه این محققین احتمال وجود عفونت همزمان مورد بررسی قرار نگرفته است (۱۲). شیوع این دو عامل در برخی کشورها از جمله ایران از ۸ تا ۹۰ درصد گزارش شده است. متاسفانه در درمان آبسه‌های چرکی به حضور این دو عامل چرکزا در دامداری‌ها اهمیت زیادی داده نشده و دامداران از خسارات اقتصادی ناشی از این دو باکتری آگاه نیستند. احتمالاً میزان مرگ و میر کم این دو عامل در مقایسه با سایر باکتری‌های خطرناک موجب نادیده انگاشته شدن خسارات اقتصادی ناشی از این عوامل چرکزاست. Jesse و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند حضور این دو عامل خصوصاً *کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس* در اندام‌های تولیدمثلی بعد از ۶۰ تا ۹۰ روز باعث تغییرات هورمونی شده و ناباروری ایجاد می‌کند (۲۳،۲۴).

شناسایی این دو عامل در مراحل اولیه بیماری، پیش آگهی مناسبی در درمان خواهد داشت. اگرچه کشت و روش‌های بیوشیمیایی از روش‌های روتین در آزمایشگاه‌هاست اما به علت تنوع گسترده خصوصیات بیوشیمیایی و سخت رشد بودن این دو عامل، شناسایی دشوار بوده و در بسیاری از موارد این عوامل شناسایی نمی‌شوند. روش‌های سرولوژی خصوصاً الیزا هرچند حساسیت بالاتری دارند اما به دلیل شباهت‌های آنتی‌ژنی بین گونه‌ای باعث افزایش احتمال نتایج کاذب می‌شوند. از طرف دیگر روش‌های سرولوژی مبتنی برالیزا در حال حاضر بسیار پر هزینه بوده و در مراحل اولیه بیماری نیز قابل استفاده نمی‌باشند. از این‌رو معرفی یک روش مناسب قطعی و ویژه مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی عامل بیماری از روی محیط‌های کشت و یا تشخیص مستقیم از نمونه‌های عفونی در جهت کنترل و ریشه‌کنی این عوامل بسیار کمک‌کننده می‌باشد (۹،۲۵).

نتیجه‌گیری نهایی: در ایران، تاکنون مطالعات زیادی در مورد میزان شیوع آلودگی آبسه‌های جلدی و زیر جلدی با عوامل *کورینه باکتریوم پزودوتوبرکلوزیس و تروپرلا پیوژنز* و همکاری این دو عامل در ایجاد عفونت همزمان صورت نگرفته‌است. در مطالعه

حاضر نشان داده شد *کورینه باکتریوم پزودوتوبرکلوزیس و تروپرلا پیوژنز* از عوامل اصلی ایجاد آبسه‌های جلدی در گاو می‌باشند. از آنجایی‌که حضور همزمان این دو باکتری می‌تواند موجب ناکامی در درمان، عود بیماری و شدت عفونت شود، بنابراین توجه به یک روش مناسب و دقیق، در تشخیص، کنترل و ریشه‌کنی این دو عامل، در مراحل اولیه عفونت اهمیت بسیار زیادی دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از اعضای محترم گروه میکروبیولوژی-ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان که در کلیه مراحل انجام این مطالعه یاری رساندند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 2nd ed. Wiley Blackwell publication. Hoboken, USA; 2011.
2. Narayanan S, Nagaraja TG, Wallace N, Staats J, Chengappa MM, Oberst RD. Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and A. pyogenes-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. Ameri Vet Res. 1998; 59: 271-276. PMID: 9522943
3. Nur Amirah AL, Faez Firdaus JA, Aishatu MO, Adza R, Eric Lim TC, Mohd ZS, Abdul Aziz S, Abdul Wahid H, Mohd Azmi Ml. Isolation and detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in the reproductive organs and associated lymph nodes of non- pregnant does experimentally inoculated through intradermal route in chronic form. Vet Word. 2015; 8(7): 924-927. doi: 10.14202/vetworld.2015.924-927 PMID: 27047177
4. Sood NK, Sandhu BS, Gupta K, Narang D, Vasudeva K, Singh ND. Mesenteric caseous lymphadenitis in a cow calf caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis*: a case report, Vet Medicin. 2012; 57(7): 371-375. doi: 10.17221/6266-VETMED
5. Barakat AA, Selim SA, Atef A, Saber MS, Nafie EK, EI-Ebeedy AA. Two serotypes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from different animal species. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 1984; 3(1): 151-63. doi: 10.20506/rst.3.1.147 PMID: 32987978
6. Tabatabayi AH, Firouzi R. Disease of Animal Due to Bacteria. Tehran University Press. Tehran, Iran; 2001.
7. Omar AR. Polymerase chain reaction detection of *C. pseudotuberculosis* in the brain of mice following oral inoculation. Int J Anim Vet Adv. 2013; 5(1): 29-33. doi: 10.19026/ijava.5.5571
8. McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM. Veterinary microbiology, 3rd ed. Wiley- Blackwell publication. New Delhi, India; 2013.
9. Ashrafi TI, Mohammadzadeh A, Zahraei ST, Mahmoodi P. Genomic characterization, detection of genes encoding virulence factors and evaluation of antibiotic resistance of *Trueperella pyogenes* isolated from cattle with clinical metritis. Antonie van Leeuwenhoek. 2018; 111: 2441-2453. doi: 10.1007/s10482-018-1133-6 PMID: 30066209
10. Kotrajaras R, Tagami H. *Corynebacterium pyogenes*. Its pathogenic mechanism in epidemic leg ulcers in Thailand. Dermatol J. 1987; 26: 45-50. doi: 10.1111/j.1365-4362.1987.tb04575.x PMID: 3549593
11. Sawyer GJ. Observation on the bacterial population of the cervix of the ewe before and after embryo death. Austral Vet J. 1977; 53: 542-544. doi: 10.1111/j.1751-0813.1977.tb07942.x PMID: 612334
12. Bazargani T, Ashrafi HJ, Ashrafi TI, Mehdizadeh S. Incidence and outbreak of soil born disease (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) in a large dairy in western of Tehran; The first report from Iran. Iran J Vet Clin Sci. 2013; 7(1): 41-72.
13. Yeruham I, Braverman Y, Shpigel NY, Chizov- Ginzburg A, Saran A, Winkler M. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the feasibility of transmission by houseflies. I. Vet Q. 1996; 18(3): 87-9. doi: 10.1080/01652176.1996.9694623 PMID: 8903139
14. Scott PR, Penny DC, Macrae AI. Cattle Medicine, 1st ed. Manson Publishing Ltd. London. UK; 2011.
15. Khuder Z, Osman AY, Jesse FF, Haron AW, Saharee AA, Sabri J, Yusoff R, Abdullah R. Sex hormone profiles and cellular changes of reproductive organs of mice experimentally infected with *C. pseudotuberculosis* and its exotoxin phospholipase D (PLD). LOSR. J Agric Vet Sci. 2012; 1(3): 24-29. doi: 10.9790/2380-0132429
16. Sol J. Summer mastitis: pathogenesis, losses, incidence and prevention. Tijdschr Diergeneeskd. 1983; 108: 443-452. PMID: 6349011
17. Yeruham I. Elad D. Friedman S, Perl S. An outbreak of necrotic and ulcerative dermatitis on the fetlock in heifers in a dairy herd infected with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Vet Record. 2003; 152: 598-600. doi: 10.1136/vr.152.19.598 PMID: 12762490
18. Timoney JF, Gillespie JA, Scott FW, Barlough JE. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed. Cornell University Press, Ithaca, United States; 1988.
19. Carter GR, Chengappa MM, Claus W, Rikihisa Y. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA; 1991.
20. Melissa M, Ternur MS, Deperno ChS, Conner MCT, Brian Eyler MS, Lancia RA, Klaver RW, Stoskopf MK. Habitat, wildlife, and one health: *Arcanobacterium pyogenes* in Maryland and Upper Eastern Shore white-tailed deer populations, Infect Ecol Epidemiol. 2013; 3: 1-10. doi: 10.3402/iee.v3i0.19175 PMID: 23930157
21. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine. 10th ed. London, UK; 2007. p. 1094-1110.
22. Bicalho Ml, Machado VS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. Association between virulence factors of

Escherichia coli, *Fusobacterium necrophorum* and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. Vet Microbiol. 2012; 157: 125-131. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.11.034 PMID: 22186615

23. Jost BH, Billington SJ. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie Van Leeuwenhoek. 2005; 88: 87-102. doi: 10.1007/s10482-005-2316-5 PMID: 16096685
24. Jesse FF, Adamu L, Osman AY, Muhdi AF, Saharee AA, Saad MZ, Omar AR. Polymerase Chain Reaction Detection of "*C. pseudotuberculosis*" in the Brain of Mice Following Oral Inoculation. Int J Anim Vet Advan. 2013; 5(1): 29-33. doi: 10.19026/ijava.5.5571
25. Dorella FA, Pacheco LGC, Oliverira SC, Miyoshi A, Azevedo V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet Res. 2006; 37: 201-218. doi: 10.1051/vetres:2005056 PMID: 16472520

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 1, 2022
Original Article

Isolation and Molecular Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Trueperella pyogenes* from Cutaneous Abscesses in Dairy Cattle Farms Around Tehran

Khatereh Kafshdouzan[1], **Iradj Ashrafi Tamai**[2], **Jamil Ataei**[2], **Taghi Zahraei Salehi**[2]

[1] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran*
[2] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2021.297020.3021

Received: *23 January 2022*, ***Accepted:*** *16 March 2022*

Abstract

BACKGROUND: *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Trueperella pyogenes* are two important pyogenic bacteria that cause many annual economic losses worldwide. Currently, antibiotic resistance of these bacteria is on the rise. Early detection of infection with these bacteria is important for controlling the infections caused by these two bacteria.

OBJECTIVES: This study aimed to investigate the contamination of cattle cutaneous abscesses with *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Trueperella pyogenes* in five large cattle farms around Tehran and propose an accurate method for a rapid detection of these two bacteria.

METHODS: Out of 60 cows involved in cutaneous abscesses in the summer of 2018, sterile sampling was performed to diagnose the bacterial agent that caused the abscess. Bacteriological examination of the samples was performed using standard biochemical reactions and polymerase chain reaction using specific primers.

RESULTS: Of the 60 samples studied, 25 % (15.60) were isolated as *Corynebacterium pseudotuberculosis* and 20 % (12.60) as *Trueperella pyogenes*. In 55 % of the samples (33.60), both bacteria were present simultaneously. All the samples detected using biochemical reactions were confirmed by the polymerase chain reaction.

CONCLUSIONS: *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Trueperella pyogenes* are the main causes of cutaneous abscess in cattle farms around Tehran. Because the accurate diagnosis of the cause of abscesses is very important for effective treatment, polymerase chain reaction, based on 16S-23S rDNA and 16S rRNA, can be used to rapidly and accurately detect these bacteria in the early stages of the infection.

Keywords: Abscesses, Molecular identification., Co-infection, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Copyright © 2022. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: kafshdouzan@semnan.ac.ir Tel/Fax: 023-33654214

How to cite this article:

Kafshdouzan K, Ashrafi Tamai I, Ataei J, Zahraei Salehi T. Isolation and Molecular Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and *Trueperella pyogenes* from Cutaneous Abscesses in Dairy Cattle Farms Around Tehran. J Vet Res, 2022; 77(1): 47-54. doi: 10.22059/jvr.2021.297020.3021

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The results of the biochemical tests in C. *pseudotuberculosis* and *T. pyogenes*.
Table2. Oligonucleotide primer sequences and thermal PCR conditions.
Figure 1. Gram-positive pleomorphic coccobacillus bacteria.
Figure 2. *Trueperella pyogenes* on blood agar media with beta-hemolytic zone.
Figure 3. PCR products obtained using the primer set 16S-23S DNA of *T. pyogenes*. Lane 1: Negative control, Lane 1-5: *T. pyogenes* strains, Lane 6: Positive control, Lane M: Ladder 100bp.
Figure 4. PCR products obtained using primer set 16SrRNA of C. *pseudotuberculosis*. Lane 1: Negative control, Lane 1-5: C. *pseudotuberculosis* strains, Lane 6: Positive control, Lane M: Ladder 100bp.