مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۴، ۵۰۶-۴۹۹
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.238556.2672

جداسازی و شناسایی مولکولی تروپر لا پیوژنز به عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده آبسه‌های جلدی در گاوها

ایرج اشرافی تمای[۱] عبدالمجید محمدزاده[۱*] پژمان محمودی‌کوهی[۱] تقی زهرایی صالحی[۲]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ مرداد ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۹ مهر ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: عوامل متعددی می‌توانند در ایجاد آبسه‌های جلدی در گاو دخیل باشند که دراین میان تروپر لا پیوژنزبه عنوان یک باکتری فرصت طلب، اهمیت فراوانی در ایجاد بیماری‌های چرکی دارد و خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت گاوداری‌ها وارد می‌نماید. **هدف:** این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی تروپر لا پیوژنز به عنوان یک پاتوژن فرصت طلب و همچنین نشان دادن مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری انجام شد. **روش کار:** از ۱۳۴ گاو مبتلا به آبسه جلدی، در ۱۵ گاوداری اطراف تهران، نمونه اخذ گردید و از تمامی آبسه‌ها، کشت هوازی و بی هوازی صورت گرفت و از روش‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی عوامل چرکزا استفاده شد. در مورد تروپر لا پیوژنز علاوه بر روش‌های بیوشیمیایی، از روش مولکولی نیزجهت شناسایی استفاده شد. همچنین حساسیت جدایه‌های تروپر لا پیوژنز به برخی از آنتی بیوتیک‌های روتین هم مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** ده جنس از باکتری‌های ایجاد کننده آبسه در کشت، شناسایی گردید که از میان آن‌ها تروپر لا پیوژنز شیوع بیشتری داشت. از نظر تغییرات بیوشیمیایی و تست CAMP، ۹ بیوتیپ در جدایه‌های تروپر لا پیوژنز مشاهده شد. تمامی جدایه‌های تروپر لا پیوژنز با روش مولکولی PCR تأیید نهایی گردیدند. بیشترین حساسیت آنتی بیوتیکی به آمپی سیلین، پنی سیلین G و آموکسی سیلین و بیشترین مقاومت هم به تریمتوپریم سولفومتوکسازول، اریترمایسین و تتراسیکلین مشاهده گردید. **نتیجه‌گیری نهایی:** تروپر لا پیوژنز هرچند بعنوان یک پاتوژن فرصت طلب مطرح می‌باشد ولی می‌تواند به صورت اولیه و ثانویه ایجاد بیماری کند. شناسایی عوامل ایجادکننده آبسه با روش‌های مولکولی، انجام آزمون‌های آنتی بیوگرام و انتخاب داروی مناسب، در درمان این عوامل بسیار کمک کننده می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: تروپر لا پیوژنز، آبسه‌های جلدی، باکتری‌های چرکزا، گاو

مقدمه

باکتریهای چرکزای مختلفی میتوانند عامل ایجاد آبسه‌های زیر جلدی و احشایی در گاو باشند. آبسه‌های زیر جلدی، علاوه بر تأثیر منفی در کیفیت پوست، باعث انتشار جرم و افزایش بروز آبسه‌های احشایی و موارد تورم پستان در سطح گله می‌شوند. (۱۳) یکی از عوامل مهم ایجاد کننده این عارضه، باکتری تروپر لا پیوژنز می‌باشد. تروپر لا پیوژنز که قبلاً به نام‌های اکتینومیست پیوژنز و آرکانوباکتریوم پیوژنز نامیده می‌شد و اخیرا بر اساس تفاوت‌های ژنتیکی در ۱۶SrRNA، تغییر نام پیدا کرده است (۱۸) باکتری است گرم مثبت، کوکوباسیلی نامنظم، غیر متحرک، بدون اسپور و هوازی، که به شکل همزیست در مخاطات دستگاه تنفسی فوقانی، دستگاه ادراری- تناسلی و دستگاه گوارشی دیده می‌شود. (۵) این باکتری گسترش جهانی داشته و به عنوان یک پاتوژن ثانویه در طیف وسیعی از نشخوارکنندگان اهلی و وحشی شامل گاو، خوک، گوسفند، بز، شتر، اسب، گاومیش، گوزن، غزال و همچنین پرندگان و خزندگان مطرح می‌باشد. (۴) از بیماری‌های مهمی که تروپر لا پیوژنز در گونه‌های مختلف حیوانات می‌تواند ایجاد کند می‌توان به ورم پستان‌های حاد، ورم پستان تابستانه، متریت، اندومتریت بالینی و تحت بالینی، آبسه‌های جلدی و احشایی، آرتریت، پنومونی،اندوکاردیت، استئومیلیت و عفونت‌های چرکی دیگر اشاره نمود. (۱۲) تروپر لا پیوژنز رابطه نزدیکی با دیگر باکتری‌های چرکزا مانند اشریشیاکلی، استرپتوکوکوس دیسگالاکتیه و فوزوباکتریوم نکروفوروم دارد که این امر تداوم باکتری را در ایجاد عفونت بالا برده و همچنین مقاومت باکتری را در برابر آنتی بیوتیک‌ها افزایش می‌دهد. (۲) این باکتری نه تنها در ایجاد بیماری‌های چرکی در حیوانات به خصوص در گاو و به خطرانداختن سلامت آن‌ها، اهمیت دارد بلکه خسارات سنگینی از نظر اقتصادی شامل: کاهش شدید تولید شیر، تأثیر عمیق در عملکرد باروری، حذف حیوان از گله و حذف‌اندام‌های مبتلا به خصوص کبد و ریه در کشتارگاه‌ها را باعث می‌گردد. (۷) از طرف دیگر بیماریزا بودن این باکتری در انسان بخصوص در افراد با ضعف سیستم ایمنی و افراد دیابتی، و توجه به سلامت جامعه با مصرف محصولات لبنی، اهمیت این باکتری را نشان می‌دهد. (۱۱) تروپر لا پیوژنز تعداد زیادی فاکتورهای حدت دارد که باعث افزایش پتانسیل بیماریزایی آن می‌شود. (۵) از مهمترین عوامل حدت، پیولیزین (plo) است که باعث همولیز گلبولهای قرمز و اثر سیتولیزینی بر روی لکوسیت‌ها را دارد این همولیزین به کلسترول غشاء سلولی متصل شده و با ایجاد منفذ در غشا، لیز سلولی را باعث می‌شود و همچنین در بیان سایتوکاین‌های میزبان و آسیب‌های بافتی نیز نقش دارد. نورآمینیدازهای H و P در این باکتری نقش مهمی را در اتصال باکتری به سلول‌های

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۸۱۳-۴۲۲۷۳۵۰ نمابر: ۰۸۱۳-۴۲۲۷۴۷۵ Email: Mohammadzadeh4@gmail.com

اپیتلیال و کلونیزه شدن آن ایفا می‌کند و در تخریب اسیدهای نوکلئیک و اسـید سیالیک و تأمین نیازهای کربنی و اسید نوکلئیکی باکتری را فراهم نموده و با افزایش ویسکوزیته در مخاطات از فاگوسیتوزیز باکتری جلوگیری می‌کند. همچنین انواعی از فیمبریه‌ها شامل: A،G، E و C در این باکتری در اتصال آن به مخاطات و سلول‌های اپیتلیالی مهم می‌باشند. پروتئین باند شـونده کلاژنی (cbp) و فیبرونکتینی هـم در اتصال به بافت‌های غنی از کلاژنی (تیپ۱،۲،۴) و فیبرونکتین‌ها اهمیت دارد. بعلاوه پروتئاز و DNase این باکتری هم در تخریب پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و تأمین نیازهای باکتری مهم می‌باشـند. (۵) درمان آنتی بیوتیکی در مورد آبسه‌های جلدی بسـیار شـایع بوده و غالباً هم بدون در نظر گرفتن عامل ایجاد کننده آبسه و بـدون آنتی بیوگرام صورت می‌پذیرد. از این رو، با مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها در قسمت درمان و یا مصرف آنتی بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشـد و یا عوامل پیشگیری کننده، مقاومت این باکتری به تعداد متعددی از آنتی بیوتیک‌ها را باعث شـده است. (۱۵) بنابراین شناسایی عامل ایجاد کننده آبسه، اسـتفاده از روش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی و مشخص نمودن ژن‌هـای مقاومت آنتی بیوتیکی با روش‌هـای مولکولی، می‌تواند هم در درمان و انتخاب آنتی بیوتیک مناسـب و هم شناسـایی سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها کمک کننده باشد. هدف از این مطالعه، جداسازی عوامل ایجاد کننده آبسـه‌های جلدی و شناسایی تروپر لا پیوژنز به عنوان یکی از مهمترین عامل ایجاد کننده آبسه در گاو با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و بررسی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در جدایه‌های تروپر لا پیوژنز می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونـه گیری: نمونه گیـری در بهار۱۳۹۶ از ۱۳۴ گاو مبتلا به آبسـه جلدی در ۱۵ گاوداری اطراف تهران صورت گرفت. در مورد آبسه هایی که سر باز کرده بودند با استفاده از سواب استریل و از عمق آبسه نمونه گیری انجام شد و در مورد آبسه هایی که کامل بودند پس از استریل کردن سطح آبسه‌ها با الکل ۷۰٪، با استفاده از سرنگ، محتویات داخل آبسه تخلیه شده و نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشـگاه ارسال و کشت انجام گرفت. همچنین قطعاتـی ازعضلات زیر جلدی، پوسـت دچار زخم و قسـمتی از گره‌های لمفاوی گاوها که به صورت مزمن درگیر لمفادنیت ناشی از این باکتری‌ها شده بودند، جهت بررسی‌های آسیب شناسی برداشت شده و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردیدند.

کشت و جداسازی: از تمامی نمونه‌های اخذ شده، گسترش تهیه شده و همچنین کشـت بر روی محیط‌های بلاد آگار با ۵٪ خون گوسـفندی و مک کانکی انجام پذیرفت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای۳۷ °C به صورت هوازی و بی هوازی انکوبه گردید. از همه پلیت‌ها پس از رشـد، گسـترش تهیـه شـد و رنگ آمیـزی گرم انجـام گرفت و جهت تشـخیص عوامل عفونی آزمایشات بیوشیمیایی انجام گرفت. در مورد باکتری تروپر لا پیوژنز آزمایشـات بیوشیمیایی شامل: کاتالاز، اکسـیداز، احیاء نیترات، هیدرولیز ژلاتین و آسکولین، آزمون شیر تورنسله، هضم سرم منعقده، بررسی آنزیم اوره از، تخمیر قندهای گلوکز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، سـاکارز، گزیلوز و تست کمپ انجام گرفت (۱).

بررسـی حساسـیت آنتی بیوتیکی: جهت این آزمون از روش دیسک دیفیوژن وبر اسـاس روش کربی بایر مطابق دستورالعمل توصیه شده سال ۲۰۰۱ و از آنتی بیوتیک‌های روتین در دامپزشـکی و پزشکی استفاده شد (۸). محیط کشـت ایـن آزمون، مولرهینتـون آگار (Merck) با ۵ ٪ خون گوسفندی و دیسـک‌های آنتی بیوتیکی (Mast) شامل: انروفلوکساسین (ENF ۵ µg)، تتراسـیکلین (TE ۳۰ µg)، اریترومایسـین (E ۱۵ µg)، سیپروفلوکساسـین (CIP ۵ µg)، تریمتوپریم سولفومتوکسـازول (SXT ۲۵ µg)، آموکسی سیلین (AP۲۵µg)، آمپی سیلین (A۲۵µg)، جنتامایسین (GM ۱۲۰ µg)، پنی سیلین G (units ۱۰ PEG) و اسپکتینومایسین (µg SPC ۱۰۰) بود. نتایج بعد از ۴۸ ساعت قرائت گردید.

اسـتخراج DNA و آزمـون PCR: جدایه‌هـا در محیط کشـت TSB براث (Merck) با ۵ ٪ سـرم گاوی کشـت داده شـد و در ۳۷ °C به مدت ۴۸ سـاعت انکوبه گردید. سه میکرولیتراز محیط TSB را سانتریفوژ نموده و رسـوب باکتریایی، پس ازشستشـو با سـرم فیزیولوژی و با اسـتفاده از کیت اسـتخراج DNA برای باکتری‌های گرم مثبـت (MBST, IRAN) اسـتخراج شـد و DNAها در منفی ۲۰ °C نگهداری شـد. در این مطالعه توالـی اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهـای ۱۶S- ISR-۲۳S جهت آزمون PCR ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول آماده کار(مستر میکس ۲X شرکت BIONEER کشور کره، Cat No. CSTMK -۱۰۶S) ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر F و R (با غلظت ۱۰ pmol/µl)، ۳ µl از DNA و حجم نهایی با آب مقطر به ۲۵ µl رسید. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر می‌باشد:
(F:۵'-GTTTTGCTTGTGATCGTGGTGGTTATGA۳-
و R: ۵'- AAGCAGGCCCACGCGCAGG۳-').

واکنـش PCR در دسـتگاه ترموسـیکلر (Techne, ۵۱۲ -TC England) در ۳۵ سـیکل با واسرشت اولیه ۹۵ °C، ۵ دقیقه، با تکرار سه مرحله واسرشت: ۹۵ °C، ۶۰ ثانیه، مرحله اتصال: ۶۰ °C، ۶۰ ثانیه و مرحله همانند سـازی ۷۴ °C، ۳ دقیقه انجام پذیرفـت و در انتها ۷۴ °C به مدت ۷ دقیقه سـیکل انتهایی همانندسازی خاتمه یافت (۱۷). ۵ µl از محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ ٪ با بافر TBE (۱X) الکتروفورز با ولتاژ۱۰۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۱µg/ml) با دستگاه ایلیومیناتورمورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

کشـت و تست‌های بیوشـیمیایی: در اسمیر تهیه شـده از آبسه‌های

جدول ۱. عوامل باکتریایی جدا شده از کشت آبسه‌های جلدی در گاو با درصد فراوانی آن‌ها.

باکتری	تعداد	٪	باکتری	تعداد	٪
تروپر لا پیوژنز (خالص)	۲۳	۱۷/۱۶	تروپر لا پیوژنز + اشریشیاکلی	۸	۵/۹۷
کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس (خالص)	۲۵	۱۸/۶۵	تروپر لا پیوژنز +کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس	۱۴	۱۰/۴۴
فوزوباکتریوم نکروفوروم (خالص)	۱۲	۸/۹۵	کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس + اشریشیاکلی	۶	۴/۴۷
اشریشیاکلی (خالص)	۶	۴/۴۷	تروپر لا پیوژنز + فوزوباکتریوم نکروفوروم	۸	۵/۹۷
استافیلوکوکوس اینترمدیوس (خالص)	۶	۴/۴۷	تروپر لا پیوژنز + استافیلوکوکوس اینترمدیوس	۷	۵/۲۲
پسودوموناس آئروژنوزا (خالص)	۲	۱/۴۹	تروپر لا پیوژنز + استرپتوکوکوس آلفا همولیتیک	۴	۲/۹۸
کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس+ استافیلوکوکوس اینترمدیوس	۶	۴/۴۷	تروپر لا پیوژنز + پاستورلا مولتی سیدا	۲	۱/۴۹
کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس + کلبسیلا	۱	۰/۷۴	تروپر لا پیوژنز + استافیلوکوکوس اورئوس	۴	۲/۹۸

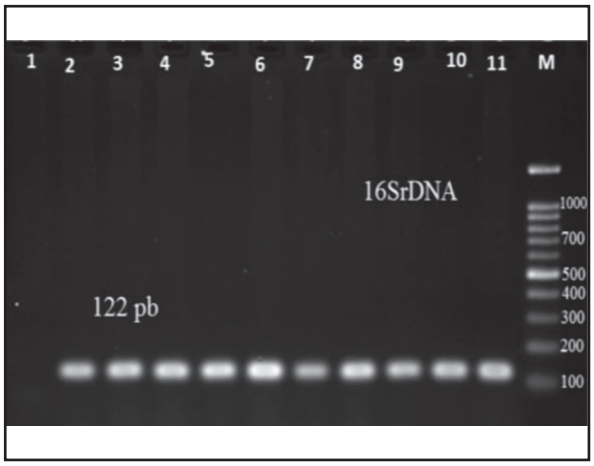
جدول ۲. حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه‌های تروپر لا پیوژنز مربوط به آبسه‌های جلدی در گاو.

آنتی بیوتیک	حساس (٪)	نیمه حساس(٪)	مقاوم (٪)
انروفلوکساسین	۵۳	۱۶/۵	۳۰/۵
سیپروفلوکساسین	۵۸	۱۵	۲۷
تتراسیکلین	۳۳/۲	۱۹/۳	۴۷/۵
اریترومایسین	۲۳/۵	۲۳/۵	۵۳
جنتامایسین	۸۴/۵	۱۵/۵	۰
اسپکتینومایسین	۷۹	۱/۶	۱۹/۴
تریمتوپریم سولفومتوکسازول	۰	۰	۱۰۰
پنی سیلین G	۱۰۰	۰	۰
آمپی سیلین	۱۰۰	۰	۰
آموکسی سیلین	۱۰۰	۰	۰

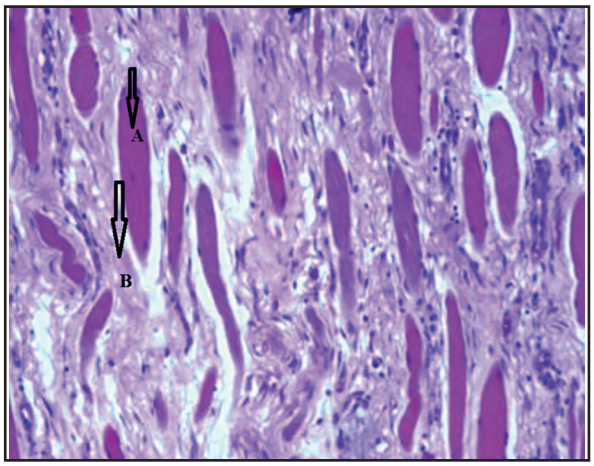
جلدی، کوکوباسیل‌های ریز گرم مثبت با اشکال نامنظم، کوکسی‌های گرم مثبت، کوکوباسیل‌های گرم منفی مشاهده شد. بر روی بلاد آگار و مک کانکی بعد از ۴۸ ساعت، کلنی‌های متفاوتی مشاهده گردید که برای شناسایی از محیط انتخابی و افتراقی استفاده شد. کلنی‌های ریز سفید رنگ با همولیز کامل و باریک در اطراف کلنی که بر روی محیط مکانکی رشدی نداشت مشکوک به تروپر لا پیوژنز بود که درگسترش تهیه شده از پرگنه‌ها نیز کوکوباسیل‌های گرم مثبت با اشکال نامنظم مشاهده شد. تست‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، احیاء نیترات و آسکولین برای این باکتری منفی بود. هیدرولیز ژلاتین و سرم منعقده مثبت بود و در شیر تورنسله مراحل اسیدی شدن، لخته، احیا و هضم پروتئین صورت گرفته بود. تست CAMP این باکتری با استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بود هر چند همولیز محل تقاطع باکتری تروپر لا پیوژنز با استافیلوکوکوس اورئوس در برخی جدایه‌ها ضعیف و در برخی دیگر قوی بودند. همچنین تخمیر قندهای گلوکز، لاکتوز، ساکارز، گزیلوز، مالتوز و مانیتول در بین جدایه ها، متغیر مشاهده گردید. دیگر کلنی‌های رشد کرده در محیط بلاد آگار و مک کانکی هم شناسایی شدند که نتایج در جدول ۱ آورده شده است. از کشت باکتریایی ۱۳۴ آبسه، تعداد ۱۰ جنس باکتری جدا گردید که در ۷۴ نمونه (۵۵/۲۲ ٪) رشد باکتری به صورت خالص و در ۶۰ نمونه (۴۴/۷۸ ٪) مخلوطی از دو باکتری شناسایی گردید. از این بین، کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس با ۲۵ جدایه خالص و ۱۳ جدایه مخلوط و تروپر لا پیوژنز با ۲۳ جدایه خالص و ۳۳ جدایه مخلوط با دیگر باکتری ها، بیشترین عوامل آبسه‌ای را به خود اختصاص داده بودند.

نتایج آنتی بیوگرام: تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار نشان داد که مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی در بین جدایه‌های تروپر لا پیوژنز هم دیده می‌شود. بیشترین میزان مقاومت به آنتی بیوتیک‌های تریمتوپریم سولفومتوکسازول (۱۰۰٪)، اریترومایسین (۵۳٪)، تتراسیکلین (۴۷٪) مشاهده شد. همچنین مقاومت ۳۰/۵ و ۲۷ درصدی انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین هم در بین جدایه‌ها دیده شد. در مقابل بیشترین میزان حساسیت در مقابل آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، پنی سیلین G و آموکسی سیلین مشاهده شد (جدول ۲).

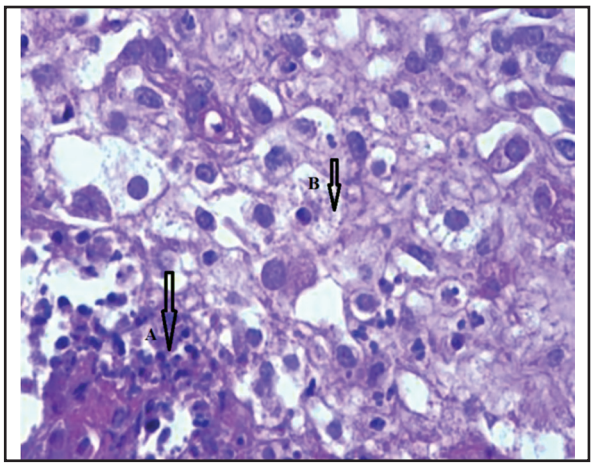
نتایج بررسی‌های هیستوپاتولوژی: درمشاهده میکروسکوپی پوست و بافت عضلات اسکلتی زیر جلدی، تغییرات قابل توجهی شامل حضور آبسه‌های مزمن و متعدد مشهود بود. در مرکز آبسه، تجمع اکسودای چرکی متشکل از نوتروفیلهای زنده، دژنره و خرده ریزهای سلولی مشاهده شد. در پیرامون مرکز آبسه، سلول‌های تک هسته‌ای متشکل از سلول‌های لمفوئیدی در مراحل مختلف تکامل سلولی تجمع داشتند. ماکروفاژها در بستری از بافت همبند سست حضور داشته و در لایه بعدی بافت جوانه گوشتی پر عروق و در نهایت بافت همبند فیبروزه قرار داشت. واکنش التهابی



تصویر۱. نتایج PCR برای شناسایی تروپر لا پیوژنز: چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲ تا ۱۰جدایه‌های تروپر لا پیوژنز،چاهک ۱۱ کنترل مثبت و تأیید شده با سکانس، چاهک M مارکر ۱۰۰ جفت باز.



تصویر۲. آتروفی و فیبروز منتشره عضلانی (A) و نکروز زنگر (B) در آبسه زیر جلدی ناحیه نزدیک گردن (هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰×).



تصویر۳. تجمع باکتریایی ، لنفوسیت‌ها (A) وماکروفاژهای حاوی باکتری تروپر لا پیوژنز(B) در آبسه گردنی (هماتوکسیلین- ائوزین، ۴۰۰×).

مزمن، در بخش‌های میانی و عمقی پوست و در لایه عضلانی اسکلتی نفوذ نموده و جایگزین بخشی از آن شده بود. در ناحیه‌ای که عضلات درگیر بودند، نکروز زنکر سلول‌های عضلانی و تغییرات دژنراتیو قابل رؤیت بود. همچنین، در میان سلول‌های عضلانی، سلول‌های فیبروبلاست، فیبروسیت و سلول‌های التهابی از نوع لمفوئیدی، ماکروفاژ و نوتروفیل نفوذ نموده و موجب گسیختگی در بافت شده بود (تصویر ۱،۲).

نتایج PCR: تمامی جدایه‌های تروپر لا پیوژنز که با روش بیوشیمیایی تأیید شده بودند با نشان دادن وزن مولکولی ۱۲۲ جفت باز در ژل آگارز، تأیید نهایی گردیدند. درکنترل مثبت تروپر لا پیوژنز هم باند ۱۲۲ جفت باز مشاهده شد و در کنترل منفی با آب مقطر باندی مشاهده نشد (تصویر ۳) تفسیر سکانس یکی از جدایه‌ها که در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت استفاده شد در تصویر ۴ مشاهده می‌شود.

بحث

تروپر لا پیوژنز و کورینه باکتریوم پزودوتوبرکلوزیس هردو از اجرامی هستند که علاوه بر آبسه‌های زیر جلدی، نقش مهمی در ایجاد آبسه‌های داخلی و تورم پستان دارند، لذا این دو باکتری، مسئول خسارات اقتصادی مستقیم ناشی از حذف گاو از گله و یا حذف لاشه، ضبطاندام‌های مختلف خصوصا کبد و ریه، افت کیفیت لاشه و پایین آمدن راندمان گله می‌باشند. (۱۲) در دهه‌های گذشته، تروپر لا پیوژنز به عنوان یک عامل فرصت طلب عفونی و چرکزا در بین حیوانات اهلی مطرح بود مطالعاتی وسیعی بر روی این باکتری صورت گرفته و نشان داده شده که این باکتری طیف وسیعی از میزبانان را درگیر می‌کند و بیماری‌های متعددی را دراندام‌های مختلف ایجاد می‌کند. این باکتری به عنوان یک عامل آسیب‌زای رایج همراه با علائم بالینی چرکی در بین گاوها بسیار مطرح می‌باشد. از بیماری‌های مهم در بین گاوها می‌توان به ورم پستان، لنفادنیت، متریت، پیومتر، التهاب ناف، آبسه‌های زیرجلدی، التهاب پروستات، اورکیت، پریکاردیت، انسفالیت، سپتی سمی و سایر عفونت‌های چرکی اشاره کرد. شایع‌ترین علائمی که در گاوها دیده می‌شود ورم پستان، متریت، پنومونی و آبسه‌های جلدی و زیر جلدی هستند (۵،۱۲). تروپر لا پیوژنز رایج ترین جرمی است که به دنبال جراحات پوستی وارد بدن گاو شده و باعث ایجاد آبسه یا سلولیت می‌شود. جراحات پوستی، به دنبال نزاع به خصوص در گاوهای نر، در دوره زمین گیری در اثر بیماری‌های متابولیک یا به دنبال تزریقات به وجود میآید که راه نفوذ خوبی برای این باکتری محسوب میشود. (۱۶) در ایران مطالعات چندانی در زمینه تروپر لا پیوژنز و خسارات ناشی از آن صورت نگرفته است ولی با توجه به اینکه، این باکتری ایجاد کننده آبسه جلدی و زیر جلدی، معمولاً باعث ایجاد آبسه‌های داخلی ، متریت‌های پس از زایمان و تورم پستان می‌شوند و در غالب موارد، گاوها، مخلوطی از علائم را نشان میدهند خسارات فراوانی را به صنعت گاوداری وارد می‌کند. در مطالعه‌ای که توسط Nagaraja و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی آبسه‌های کبدی در آمریکا صورت گرفت مشخص گردید در ۵۰٪ موارد عامل عفونت تروپر لا پیوژنز

Download GenBank Graphics Sort by: E value ▼ Next ▲ Previous

Trueperella pyogenes strain Arash114 chromosome, complete genome

Sequence ID: CP028833.1 Length: 2338282 Number of Matches: 2

Related Inform

Range 1: 537375 to 537465 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
124 bits(67)	3e-25	84/92(91%)	2/92(2%)	Plus/Plus

```
Query  13      CCACACCCCAACAGCATGCCAACTCCAATGTTGCCAACCACTAAAAACCCCCACAACACT  72
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537375  CCACACCCCAACAGCATGCCAACTCCAATGTTGCCAACCACTAAAAACCCCCACAACACT  537434

Query  73      CCATAACCCCCCGGATCCCA-GCCAAACCGGA  103
               | |||||| ||  |||| || || |||| |||
Sbjct  537435  C-ATAACCACCACGATCACAAGCAAAACAGGA  537465
```

تصویر۴. نتیجه سکانس یکی از جدایه‌های تروپر لا پیوژنز با پرایمر ۱۶S.

بوده و بصورت میانگین سالانه ۳۰۰۰ کبد به دلیل آلودگی به این باکتری در کشتارگاهها حذف می‌گردد.(۹) همچنین مشخص شد تغییرات کربوهیراتی در شکمبه باعث انتشار این باکتری به کبد شده و آبسه‌های احشایی ایجاد می‌گردد بنابر این آبسه‌های جلدی و زیر جلدی بعنوان یک مخزن مهم در ایجاد عفونت دراندام‌های دیگر می‌تواند مطرح باشد. (۱۰) در مطالعه Yeruham و همکاران در فلسطین اشغالی در سال ۲۰۰۳، مشاهده شد که تمام دام هایی که آبسه‌های زیر جلدی داشتند به شکل احشایی نیز مبتلا بودند. در این مطالعه هم تروپر لا پیوژنز به عنوان یک عامل اصلی مطرح بود. (۱۹) در مطالعه حاضر نیز تروپر لا پیوژنز به عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجاد کننده آبسه‌های جلدی در گاو، در بین دیگر عوامل ایجاد کننده آبسه، مطرح می‌باشد. از طرف دیگر رابطه نزدیک این باکتری با باکتری‌های چرکزای دیگر در ایجاد آبسه و افزایش تداوم باکتری در جهت ایجاد عفونت بالا در این مطالعه نشان داده شد. شناسایی ۳۳ نمونه (۵۵٪) تروپر لا پیوژنز با دیگر باکتری‌های چرکزا در محیط کشت از ۶۰ نمونه مخلوط کل، نشان دهنده قدرت این باکتری در رشد مخلوط با عوامل عفونی دیگر، در جهت بالا بردن سطح عفونت و همچنین افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشد. در این تحقیق، مهمترین باکتری‌های مخلوط با تروپر لا پیوژنز به ترتیب کورینه باکتریوم پسودوتوبرکلوزیس، فوزوباکتریوم نکروفوروم، اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اینترمدیوس و استرپتوکوکوس آلفا همولیتیک بودند. (جدول ۱)

هر چند روش معمول شناسایی تروپر لا پیوژنز بر اساس روش‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی است ولی متغیر بودن برخی از خصوصیات این باکتری تشخیص را دشوار می‌کند در مطالعه‌ای که Magdalena و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ایزوله‌های گوزن اروپایی انجام دادند ۱۴ بیوتیپ از نظر تغییرات بیوشیمیایی و تست CAMP شناسایی گردید. در این مطالعه استفاده از روش مولکولی در جهت شناسایی تروپر لا پیوژنز توصیه گردیده است. (۶) در مطالعه حاضر نیز بر اساس متغیر بودن تخمیر قندهای مورد آزمایش توسط جدایه‌های تروپر لا پیوژنز و همچنین تغییر همولیز و تست CAMP این باکتری در جدایه‌های مختلف، ۹ بیوتیپ شناسایی گردید. بنابر این استفاده از روش‌های مولکولی مانند PCR در تشخیص تروپر لا پیوژنز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه تمامی جدایه ها، با این روش مولکولی شناسایی و تأیید نهایی گردید. در مطالعه‌ای که Ertas و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی ۵۰۰ کبد گاو انجام دادند ۱۰۰ کبد دارای آبسه بود که مورد کشت قرار گرفت که از این بین، ۴۰٪ با روش مولکولی PCR، تروپر لا پیوژنز تشخیص داده شد (۳).

ظاهرا سفالوسپورین ها، تتراسیکلین، پنی سیلین، و دیگر بتالاکتام‌ها درمان‌های انتخابی در عفونت‌های تروپر لا پیوژنز می‌باشند ولی اخیرا مقاومت‌های آنتی بیوتیکی برخی از آنتی بیوتیک‌ها برای این عامل شناسایی شده است. در این مطالعه، بالاترین حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها آمپی سیلین، پنی سیلین، آموکسی سیلین با ۱۰۰ ٪ و جنتامایسین و اسپکتینومایسین با ۸۴/۵ و ۷۹ درصد مشاهده شد در حالی که مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های تریمتوپریم سولفومتوکسازول، اریترومایسین و تتراسیکلین ۱۰۰، ۵۳ و ۴۷/۵ درصد بود. همچنین مقاومت ۳۰ و ۲۷ درصدی نسبت به دو آنتی بیوتیک مهم انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین از یافته‌های مهم این مطالعه بود. رابطه معنی‌داری در بین مقاومت آنتی بیوتیکی، با ۹ بیوتیپ جدایه‌های تروپر لا پیوژنز مشاهده نشد. استفاده نامناسب از آنتی بیوتیک‌ها از علل مهم در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در این عامل بیماری محسوب می‌شود. استفاده وسیع از تتراسیکلین‌ها و ماکرولیدها در دامپزشکی به عنوان افزودنی خوراک دام برای پیشگیری از بیماری‌ها و بهبود رشد، منجر به مقاومت‌های آنتی بیوتیکی این عامل شده است. هر چند برخی از آنتی بیوتیک ها، حساسیت لازم را در برابر ایزوله‌ها در محیط آزمایشگاه را دارند ولی ایجاد کانون‌های چرکی و گرانولوماتوز توسط این باکتری و عدم نفوذ آنتی بیوتیک به درون این کانون‌ها درمان این عامل را در مراحل پیشرفته سخت می‌کند بنابر این تأخیر در تشخیص و انتخاب نامناسب دارو پیش آگهی درمان را بسیار ضعیف می‌کند. بعلاوه ایجاد این مقاومت‌های دارویی، نگرانی‌های در درمان انسان‌ها نیز دارد.

مطالعه‌ای در برزیل بر روی گونه‌های مختلف حیوانات اهلی با عفونت‌های متنوع با عامل تروپر لا پیوژنز انجام گردیده که مقاومت آنتی بیوتیکی تریمتوپریم سولفومتوکسازول، نورفلوکساسین وتتراسیکلین به ترتیب ۴۹/۳، ۱۰/۹ و ۹/۲ درصد گزارش گردیده است. (۱۴) در مطالعه‌ای دیگر که بر روی آبسه‌های سطحی و داخلی در گوزن صورت گرفته بود بیشترین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی به فلوروکوئینولون و بالاترین مقاومت به تریمتوپریم سولفومتوکسازول و بتالاکتامازها گزارش گردیده است (۲۰).

درمان اجرام چرکزا و ایجاد کننده آبسه، امر دشواری، هزینه بر و در موارد پیشرفت بیماری تقریباً ناممکن است. به دلیل تشکیل آبسه و سپس بافت فیبروزی در اطراف محل تکثیر جرم، نفوذ آنتی بیوتیک‌ها را غیرممکن کرده و به ناچار باید دام حذف گردد. بنابر این جلوگیری از انتشار این اجرام در کنترل آبسه‌های زیر جلدی از اهمیت زیادی برخوردار است. پاره شدن آبسه ها، ریختن شیر ورم پستانی و توانایی این باکتری در باقی ماندن در خاک برای چندین هفته، می‌تواند آلودگی را در سطح گله منتشر نماید. تروپر لا پیوژنز در شرایط مرطوب به سرعت منتشر میشود، چراکه رطوبت زیاد ممکن است باعث آسیب به بافت اپیدرمیس پوست شده که در این صورت باکتری می‌تواند به صورت مستقیم نیز انتقال پیدا کند، بنابراین پاکیزه و خشک نگه داشتن بستر در کنترل آبسه‌های ناشی از این جرم اهمیت دارد. (۱۳) بنابر این تروپر لا پیوژنز هرچند بعنوان یک باکتری فرصت طلب مطرح می‌باشد می‌تواند هم به صورت اولیه و هم به صورت ثانویه ایجاد بیماری کند. نقش حشرات نیز در انتقال تروپر لا پیوژنز مشخص شده است طوری که میزان وقوع آبسه‌ها از این باکتری در فصل تابستان بیشتر گزارش شده است. بنابراین مبارزه با حشرات می‌تواند یکی از راه‌های کاهش شیوع آلودگی در گله باشد. اگر چه نقش این حشرات در ورم پستان‌های تابستانه هم قابل انکار نمی باشد. (۱۳)

شناسایی عامل ایجادکننده آبسه با روش‌های مولکولی، انجام آزمون‌های آنتی بیوگرام و انتخاب داروی مناسب، در درمان این عوامل بسیار کمک کننده می‌باشند. در ایران مطالعات چندانی در مورد میزان شیوع آلودگی‌های آبسه‌های جلدی و زیر جلدی در گاو و خسارات ناشی از این باکتری صورت نگرفته است. باتوجه به اهمیت این باکتری در بیماریزایی و خسارات اقتصادی در گاو و انتقال این جرم از طریق محصولات به انسان بخصوص در افراد با ضعف سیستم ایمنی، توصیه می‌گردد مطالعات عمیقی در جهت میزان شیوع، شناسایی عوامل حدت و ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی، صورت پذیرد تا راهکارهای مناسبی در جهت مبارزه با این عامل بیماریزا ایجاد گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی باکتری شناسی آقای ایرج اشرافی تمای می‌باشد و نویسندگان از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینا همدان نهایت تقدیر و تشکر را دارند.

References

1. Al- Saggaf, M. S., Al- ssum, R. M., Shair, O. M. S. (2011) Isolation and identification of Arcanobacterium pyogenes (Actinomyces pyogenes) from Arabian gazelles. African J Biotech. 10: 18614- 18631.
2. Bicalho, M. l., Machado, V. S., Oikonomou, G., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C. (2012) Association between virulence factors of Escherichia coli, Fusobacterium necrophorum and Arcanobacterium pyogenes and uterine diseases of dairy cows. Vet Microbiol. 157: 125- 131.
3. Ertas, H. B., Kilic, A., Ozbey, G., Muz, A. (2005). Isolation of Arcanobacterium pyogenes from abscessed cattle kidney and identification by PCR. Turk J Vet Anim Sci. 29: 455- 459.
4. Gahrn Hasen, B., Frederiksen, W. (1992) Human infections with Actinomyces pyogenes (Corynebacterium pyogenes). Diagn Microbiol Infect Dis. 15: 349- 354.
5. Jost, B. H., Billington, S. J. (2005) Arcanobacterium pyogenes: molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie Van Leeuwenhoek. 88: 87- 102.
6. Magdalena, R., Ilona, S., Barbara, O., Magdalena, K. S., Dorota, C., Jaroslaw, K. (2012) Phenotypic characteristics and virulence genotypes of Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes strains isolated from European bison (Bison bonasus) Dorota. Vet Microbiol. 160: 69- 76.
7. Moore, R., Miyoshi, A., Pacheco, L.G.C., Seyffert, N., Azevedo, V. (2010) Corynebacterium and Arcanobacterium. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. (4th ed.) Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Theone, C.O. (eds). Ames (IA): Wiley Blackwell, Uk. p. 113- 147.
8. NCCLS (2001) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eleventh Informational Supplement, NCCLS document M 100- 911 (ISBN 1-56238-426-0). NCCLS, 19087- 1898, Pensylvania, USA.

9. Nagaraja, T. G., Laudert, S. B., Parrott, J. C. (1996) Liver abscesses in feedlot cattle. Part IL Incidence, economic importance, and prevention. Comp. contin edu Pract Vet. 18: 264-273.
10. Narayanan, S., Nagaraja, T. G., Staats, J., Chengappa M. M., Oberst, R. D. (1998) Biochemical and biological characterizations and ribotyping of Actinomyces pyogenes and Actinomyces pyogenes organisms from liver abscesses in cattle. Vet Microbiol. 61: 289-303.
11. Plamondon, M., Martinez, G., Raynal, L., Touchette, M., Valiquette, L. (2007) A fatal case of Arcanobacterium pyogenes endocarditis in a man with no identified animal contact: case report and review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 26: 663- 666.
12. Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Fitzpatrick, E. S., Fanning, S., Hartigan, P. J. (2011) Veterinary Microbiology and Microbial Disease. (2nd ed.) Wiley- Blackwell, UK.
13. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007) Veterinary Medicine. (10th ed.) Elsevier. London, UK.
14. Ribeiro, M. G., Risseti, R. M., Bolaños, C. A. D., Caffaro, K. A. de Morais, A.C.B., Lara, G. H. B., Zamprogna, T. O., Paes, A. C., Listoni, F. J. P., Franco, M. M. J. (2015) *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). Vet Quart. 35: 82-87.
15. Santos, T. M. A., Caixeta, L. S., Machado, V. S., Rauf, A. K., Gilbert, R. O., Bicalho, R. C. (2010) Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in Arcanobacterium pyogenes isolated from the uterus of postpartum dairy cows. Vet Microbiol. 145: 84- 89.
16. Scott, P. R., Penny, D. C., Macrae, A. I. (2011) Cattle Medicine. (1st ed.) Manson Publishing Ltd, UK.
17. Ulbegi- Mohyla, H., Hijazin, M., Alber, J., Lammler, C., Hassan, A. A., Abdulmawjood, A., Prenger- Berninghoff, E., Weiss, R., Zschock, M. (2010) Identification of Arcanobacterium pyogenes isolated by post mortem examinations of a bearded dragon and a gecko by phenotypic and genotypic properties. J Vet Sci. 11: 265- 267.
18. Yassin, A. F., Hupfer, H., Siering, C., Schumann, P. (2011) Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus Arcanobacterium Collins et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for Trueperella gen. nov.and emended description of the genus Arcanobacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 61: 1265-1274.
19. Yeruham, I., Elad, D., Friedman, S., Perl, S. (2003) an outbreak of necrotic and ulcerative dermatitis on the fetlock in heifers in a dairy herd infected with Corynebacterium pseudotuberculosis. Vet Record. 152: 598-600.
20. Zhao, K. L., Liu, Y., Zhang, X.Y., Palahati, P., Wang, H., Yue, B. (2011) Detection and characterization of antibiotic resistance genes in Arcanobacterium pyogenes strains from abscesses of forest musk deer. J Med Microbiol. 60: 1820-1826.

Isolation and molecular identification of *Trueperella pyogenes* as one of the main causative agents of cutaneous abscesses in cattle

Ashrafi Tamai, I.[1], Mohammadzadeh, A.[1*], Mahmoodi Koohi, P.[1], Zahraei Salehi, T.[2]

[1]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran*
[2]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

(Received 9 August 2017, Accepted 1 October 2017)

Abstract:

BACKGROUND: *Trueperella pyogenes* is one of the most important pathogens of cattle cutaneous abscess which causes considerable economic damage in livestock industry. **OBJECTIVES:** This study was conducted to isolate and identify *T. pyogenes* as an opportunistic pathogen and determine its antibiotic resistance. **METHODS:** 134 samples were collected from 15 cattle farms in Tehran province. The pathogenic bacteria were isolated and were initally identified by their colony morphology and biochemical characteristics. In addition, routine biochemical techniques and molecular tests used for detection of *T. pyogenes* strains. Susceptibility of *T. pyogenes* strains to antibiotics was evaluated using the disk diffusion method. **RESULTS:** The bacterial species isolated from 314 cutaneous abscesses studied were 10 genera of pathogen bacteria. *T. pyogenes* was the pioneer pathogen among other these. According to biochemical and CAMP test, nine biotypes of *T. pyogenes* were detected. All *T. pyogenes* isolates (9 biotypes) were positive for the PCR test. The highest percentage of *T. pyogenes* isolates was susceptible to ampicillin, penicillin G and amoxicillin and high resistance rates were observed for trimethoprim-sulfamethoxazole, erythromycin and tetracycline. **CONCLUSIONS:** Although *T. poygenes* is considered as an opportunistic bacterium, it could turn into a primary and secondary pathogen and consequently cause several complications. Identifying causative agents of abscess using molecular methods, performing antibiotic susceptibility assays and choosing appropriate drug are useful the treatment of such pathogens.

Keyword: *Trueperella pyogenes*, cutaneous abscesses, suppurative bacteria, cattle

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Isolated bacterial agents of bovine cutaneous abscesses.

Table 2. Antibiotic susceptibility of the *T. pyogenes* strains related to cutaneous abscesses in cattle.

Figure 1. Single PCR results for *T. pyogenes* identification. 1: Negative control, 2-10: *Trueperella pyogenes* strains, Control Positive, Ladder 100bp.

Figure 2. Affected subcutaneous skeletal muscle at the vicinity of the cervical abscess. The atrophic striated muscle due to diffused fibrosis is seen. H & E. ×100.

Figure 3. The wall of the large subcutaneous cervical abscess caused by *T. pyogenes*. The bacteria colonies and macrophages containing bacteria are evident. H&E. ×400.

Figure 4. The result of the sequence is one of the *T. pyogenes* strain with 16S primer.

***Corresponding author's email: Mohammadzadeh4@gmail.com, Tel: 0813-4227350, Fax: 0813-4227475**