دوره ۲۲، شماره ۷۱، پاییز ۱۳۹۸، صفحات: ۱۸-۱۱

مقاله پژوهشی

تعیین تیپ‌های کپسولی شایع در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد ورم پستان گاو

فرشته محمودی[۱]، حسن ممتاز[۲*]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۵/۱۷

چکیده

مقدمه: ورم پستان گاو یکی از بیماری‌های شایع در گله گاوهای شیری می‌باشد که خسارات جبران‌ناپذیری را بر صنعت گاوداری در ایران و سایر نقاط دنیا وارد می‌کند. *کلبسیلا پنومونیه* براساس آنتی‌ژن کپسولی *K*، دارای سروتیپ‌های مختلفی از جمله *K1*، *K2*، *K5*، *K54* و *K57* می‌باشد. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف ردیابی این باکتری در موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی گاو و تعیین سروتیپ‌های شایع کپسولی این باکتری انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه در مجموع ۱۰۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان از گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردید و پس از کشت میکروبی و تأیید مولکولی ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده، حضور آنتی‌ژن‌های کپسولی *K* در این ایزوله‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR: Polymerase Chain Reaction) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، ۲۰ نمونه (۲۰ درصد) در کشت میکروبی و ردیابی ژن *16S-23S ITS*، آلوده به باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بودند. آنتی‌ژن‌های کپسولی *K1*، *K2*، *K5*، *K54* و *K57* نیز به‌ترتیب دارای میزان فراوانی ۰/۸، ۲/۴، ۰، ۱/۲ و ۰/۴ درصد بودند. شایان ذکر است که آنتی‌ژن کپسولی *K2* با میزان فراوانی ۲/۴ درصد و آنتی‌ژن *K5* با میزان فراوانی صفر درصد به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین میزان فراوانی بودند. در انتها، داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزارهای SPSS 21 و Excel با مدل آماری مربع کای در سطح اطمینان ۹۵ درصد آنالیز شدند.

نتیجه‌گیری: بر مبنای نتایج، باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در نمونه‌های مورد بررسی دارای شیوع پایینی بود؛ از این رو امید است تشخیص و بررسی این عامل مؤثر در ایجاد ورم پستان از طریق ارائه برنامه‌ای ملی به‌منظور کنترل و پیشگیری از این مشکل و در نهایت کمک به کاهش خسارات بهداشتی و اقتصادی ناشی از این بیماری پرهزینه نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌ژن‌های کپسولی، *کلبسیلا پنومونیه*، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ورم پستان گاو

* **نویسنده مسئول:** حسن ممتاز، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴، ایمیل: hamomtaz@yahoo.com، hamomtaz@iaushk.ac.ir

مقدمه

ورم پستان با تغییرات فیزیکی و شیمیایی در شیر و ایجاد التهاب در غدد پستان نمایان می‌شود و یا به‌طور کلی، واکنش التهابی بافت پستان در پاسخ به عوامل باکتریال، شیمیایی، حرارتی و جراحات مکانیکی ممکن است منجر به افزایش پروتئین‌ها و سلول‌های سفید خون در بافت شیر گردد (۱). از عوامل ایجادکننده ورم پستان، عوامل بیماری‌زایی اصلی، فرعی و غیرمعمول می‌باشند که از نظر علائم ظاهری به تحت بالینی، بالینی و مزمن تقسیم می‌شوند. باکتری‌ها (*کلبسیلا پنومونیه*، *استرپتوکوک آگالاکتیه*، *دیس‌گالاکتیه*، *یوبریس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) نقش مهمی (۹۵ درصد) در ایجاد ورم پستان در دام‌ها دارند. در موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی که از متداول‌ترین اشکال عفونت پستان می‌باشند، کیفیت و مقدار شیر کاهش می‌یابد و به دلیل مخفی‌بودن چهره این عفونت‌ها، در دام گسترش می‌یابند (۲). *کلبسیلا* عضوی از تیره *کلبسیله* و از خانواده *انتروباکتریاسه* است که یک پاتوژن گرم منفی، غیرمتحرک، استوانه‌ای شکل و دارای کپسول پلی‌ساکاریدی می‌باشد. به‌طور کلی، اعضای جنس *کلبسیلا* شامل: *پنومونیه*، *اکسی‌توکا*، *تری‌ژنا*، *واری‌کولا* و *گرانولوماتیس* است که در سطح سلول‌های خود دو نوع آنتی‌ژن لیپوپلی‌ساکاریدی (آنتی‌ژن *O*) و پلی‌ساکارید کپسولی (آنتی‌ژن *K*) را بیان می‌کنند. شایع‌ترین گونه در بین اعضای جنس *کلبسیلا*، *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشد که از جمله پاتوژن‌های فرصت‌طلب و عامل عفونت در انسان و حیوانات است (۳). این باکتری عامل ایجاد ورم پستان در دام و ایجاد عفونت‌های بیمارستانی در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی بوده و به‌عنوان یک میکروارگانیسم ساپروفیت در نازوفارنکس و مجرای گوارشی شناخته می‌شود. علاوه‌براین، این باکتری منجر به ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری، اسهال، سپتیسمی و مننژیت می‌گردد.

کپسول پلی‌ساکاریدی مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی *کلبسیلا پنومونیه* بوده و ژن‌های مختلفی در سنتز آن نقش دارند. لازم به ذکر است که وجود کپسول به‌عنوان یک سد محافظتی در مقابل پدیده‌های ضد میکروبی (لیزوزیم و لاکتوفرین) عمل می‌کند (۴،۵). به‌طور کلی، *کلبسیلا پنومونیه* دارای ۷۷ سروتیپ کپسولی آنتی‌ژن *K* است که در این میان، سروتیپ‌های *K1*، *K2*، *K5*، *K54* و *K57* بیماری‌زایی بیشتری در انسان و دام دارند. باید عنوان نمود که عفونت‌های ورم پستان بیشتر مربوط به تیپ کپسولی *K2* می‌باشند (۶،۷).

باید خاطرنشان ساخت که *کلبسیلا پنومونیه* یکی از شایع‌ترین عوامل ورم پستان کلی فرمی در گاو می‌باشد که در چند سال اخیر اهمیت بسیاری (حتی بیشتر از *اشریشیا کلی*) یافته است (۸). در این راستا، Schukken و همکاران (۲۰۰۸) نسبت به افزایش حضور باکتری‌های *کلبسیلا* و *انتروباکتر* در مقایسه با *اشریشیا کلی* هشدار داده‌اند (۹). در یک بررسی که در بازه زمانی ۱۰۰ روز اول پس از زایمان در ارتباط با ۱۵۳ گاو مبتلا به ورم پستان بالینی انجام شد، ۴۰/۵ درصد از موارد ورم پستان از نوع کلی فرمی بودند که در چهار مورد از آن‌ها (۲/۶ درصد) *کلبسیلا پنومونیه* جدا گردید (۱۰).

با توجه به اینکه *کلبسیلا پنومونیه* یکی از مهم‌ترین ارگانیسم‌های ایجادکننده ورم پستان در دام می‌باشد، پژوهش حاضر با هدف تعیین تیپ‌های کپسولی شایع در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد ورم پستان گاو در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

به‌منظور انجام این پژوهش پس از هماهنگی با اداره

دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری و مراجعه به فارم‌های صنعتی در سطح استان، ۱۰۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی که دارای نتیجه + تا +++ در آزمایش CMT (California Mastitis Test) بودند، طی شش ماه دوم سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌های شیر در حجم ۲۰ میلی‌لیتر در ظروف استیل ریخته شدند و از دوشش‌های میانی پستان پس از ضد عفونی‌کردن سر پستانک گرفته شد. نمونه‌های اخذشده در مجاورت یخ و در سریع‌ترین زمان ممکن به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردیدند.

کشت و استخراج DNA

نمونه‌های شیر ابتدا در محیط غنی‌کننده TSB (Tryptic Soy Broth) (Merck، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس، به‌صورت خطی در محیط جامد EMB (Eosin Methylene Blue) (Merck، آلمان) کشت گردیدند. در ادامه، پرگنه‌های موکوئیدی لاکتوز مثبت انتخاب شدند و پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم منفی در محیط TSI (Triple Sugar Iron Agar) و اوره‌آز کشت گردیدند و آزمایش IMViC (Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, and Citrate) روی آن‌ها انجام شد. بر مبنای نتایج، پرگنه‌هایی که دارای واکنش ++-- در آزمایش IMViC و واکنش اسید/اسید در محیط TSI و اوره‌آز منفی بودند به‌عنوان پرگنه‌های *کلبسیلا پنومونیه* انتخاب شدند. ذکر این نکته ضرورت دارد که DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران (DNP^{TM}Kit, DNA Extraction Kit) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده از باکتری‌های رشدیافته استخراج گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ردیابی تیپ‌های کپسولی

برای شناسایی قطعی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* از پرایمر اختصاصی *16S-23S ITS* و به‌منظور شناسایی تیپ‌های کپسولی در این باکتری از پرایمرهای اختصاصی *K1*، *K2*، *K5*، *K54* و *K57* (سنتزشده توسط شرکت سیناژن ایران) استفاده گردید (جدول ۱).

به‌منظور ردیابی ژن‌های کپسولی، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱۰۰ نانومولار از پرایمرهای اختصاصی، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X،

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده به‌منظور ردیابی ژن‌های کپسولی در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (۱۱،۱۲)

سروتیپ کپسولی	پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	دمای اتصال	اندازه قطعه (bp)
K1	*F1-MagA* *MagA-R1*	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	۵۵	۵۴۰
K2	*K2wzy-F1* *K2wzy-R1*	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	۵۵	۶۴۱
K5	*K5wzxF360-F* *K5wzxR639-R*	TGGTAGTGATGCTCGCGA CCTGAACCCACCCCAATC	۵۵	۲۸۰
K54	*wzxK54-F* *wzxK54-R*	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT GCTTGACAAACACCATAGCAG	۵۵	۸۸۱
K57	*wzyK57-F* *wzyK57-R*	CTCAGGGCTAGAAGTGTCAT CACTAACCCAGAAAGTCGAG	۵۵	۱۰۳۷
16S-23S ITS	*16S-23S ITS -F* *16S-23S ITS -R*	ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC	۵۸	۱۳۰

۱/۲ میلی‌مولار MgCl2 و ۱ واحد از آنزیم *Taq* DNA polymerase (شرکت سیناژن، ایران) تنظیم گردید. لازم به ذکر است که برنامه دمایی برای تکثیر با توجه به دمای Tm مربوط به پرایمر تنظیم شد. در این راستا، برنامه دمایی با شرایط واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واسرشت اصلی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال معادل ۵۸ درجه سلسیوس برای ژن *16S-23S ITS* و برابر با ۵۵ درجه سلسیوس برای پرایمرهای کپسولی به مدت ۱ دقیقه، طویل‌شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید. در انتها، محصولات حاصل از واکنش PCR روی ژل آگارز ۲ درصد انتقال یافتند و الکتروفورز انجام شد (۱۱،۱۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS 21 و Excel و آزمون آماری مربع کای آنالیز گردیدند. باید خاطرنشان ساخت که این آزمون‌ها، معناداری همبستگی بین دو متغیر اسمی دارای دو سطح را بررسی می‌کنند. شایان ذکر است که (P<۰/۰۵) به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

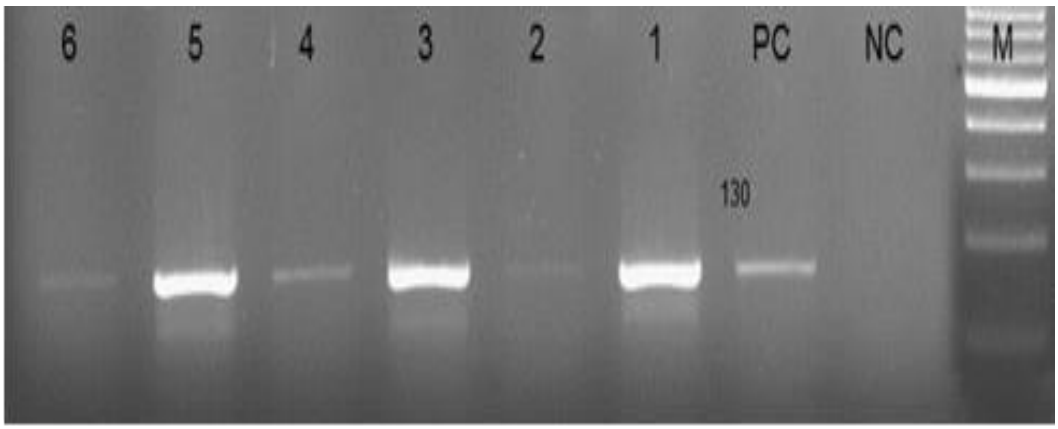
نتایج

یافته‌های مربوط به تأیید سویه کلبسیلا پنومونیه به روش PCR

از ۱۰۰ نمونه شیر اخذشده از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی، ۲۰ نمونه (۲۰ درصد) آلوده به باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بودند. ایزوله‌های جداشده در کشت میکروبی با ردیابی ژن *16S-23S ITS* در آن‌ها، با استفاده از روش PCR تأیید شدند. نتایج مربوط به الکتروفورز ژن *16S-23S ITS* در شکل ۱ ارائه شده است.

یافته‌های مربوط به تأیید سویه‌های کپسولی کلبسیلا پنومونیه به روش PCR

بر مبنای نتایج، بیشترین فراوانی مربوط به ژن *K2* (۲/۴ درصد) بود و کمترین فراوانی به ژن *K5* (۰ درصد) اختصاص داشت. فراوانی ژن‌ها در نمودار ۱ ارائه شده است. فراوانی حضور ژن‌های کپسولی (*K1*، *K2*، *K5*، *K54* و *K57*) نیز در جدول ۲ و نمودار ۱ قابل‌مشاهده می‌باشد.



شکل ۱: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16S-23S ITS* در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از ورم پستان گاو (ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون NC: نمونه کنترل منفی؛ ستون PC: نمونه کنترل مثبت؛ ستون‌های ۶-۱: نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۳۰ جفت بازی)

جدول ۲: توزیع ژن‌های کدکننده کپسولی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از ورم پستان گاو

نمونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
سروتیپ کپسولی																				
K1	+							+				+							+	
K2	+	+		+		+	+		+	+			+		+	+		+		+
K5																				
K54			+		+		+				+			+			+			
K57		+						+												

نمودار ۱: میزان فراوانی ژن‌های کپسولی در ایزوله‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از ورم پستان گاو

بحث

کلبسیلا پنومونیه جنسی یکی از بزرگترین خانواده‌های ناهمگون انتروباکتریاسه در باسیل‌های گرم منفی است که امروزه به‌عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب و عامل عفونت در انسان و حیوانات محسوب می‌شود. باکتری *کلبسیلا پنومونیه* یکی از عوامل ایجادکننده بیماری ورم پستان شایع امروزی در دام‌های شیری در سراسر جهان است. ورم پستان به التهاب غدد پستان بدون توجه به علت بروز آن اطلاق می‌گردد. این بیماری علائم گوناگونی دارد که هرکدام به نوعی باعث تغییر در کیفیت و بافت پستان می‌گردند و زیان‌های اقتصادی ناشی از آن‌ها چشم‌گیر بوده و سهم قابل‌توجهی از هزینه‌های درمانی گاوداری‌ها را به خود اختصاص می‌دهند (۱۳). در این راستا، فیروزی و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعات خود نشان دادند که هر دو نوع اجرام واگیردار (*کلبسیلا پنومونیه*) و محیطی (*اشرشیا کلی*) از عوامل اصلی ایجادکننده ورم پستان بالینی در واحدهای شیری اطراف شیراز می‌باشند. این نتایج نشان از آن داشتند که عوامل باکتریایی مذکور نقش اصلی و اساسی را در ورم پستان گاوهای شیرده در نقاط مختلف دنیا ایفا می‌کنند و با توجه به شرایط آب و هوایی، نوع عامل ایجادکننده ورم پستان در گاوها تا حدی متفاوت می‌باشد (۱۴). در پژوهشی که توسط سالکی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در ایلام انجام شد، مشخص گردید که کلی فرم‌ها از معمول‌ترین باکتری‌هایی هستند که از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی جدا می‌شوند. در پژوهش آن‌ها ۸۱/۲۵ درصد از گاوهای به ظاهر سالم مورد مطالعه مبتلا به آلودگی باکتریایی بودند. در این مطالعه سه

باکتری عامل ورم پستان معرفی گردیدند که به‌ترتیب از بیشترین تا کمترین عامل عبارت بودند از: *اشرشیا کلی* (۵۵/۳ درصد)، *کلبسیلا پنومونیه* (۴۲/۱ درصد) و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (۲/۶ درصد). در این بررسی هر دو گروه باکتری‌های عامل ورم پستان محیطی و واگیردار از موارد ورم پستان گاو جدا شدند (۱۵). شریعتی‌فر و همکاران نیز در پژوهشی ۲۹۵ رأس گاو شیری را در ۱۰ واحد گاوداری صنعتی شیری طی یک سال به لحاظ میزان آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار دادند. پس از معاینه پستان گاوها، شیر تمام کارتیه‌ها با استفاده از روش (CMT) بررسی گردید و از موارد ورم پستان، نمونه شیر برای کشت باکتریولوژی و شمارش سلول‌های سوماتیک به آزمایشگاه ارسال شد. بر مبنای نتایج، میانگین تعداد سلول‌های سوماتیک در کارتیه‌های یک مثبت، دو مثبت، سه مثبت و موارد بالینی به‌ترتیب معادل ۲۲۵، ۶۵۰، ۳۲۹۵ و ۲۱۸۶ هزار در هر میلی‌لیتر شیر برآورد گردید. شایان ذکر است که در کشت باکتریولوژی نمونه‌ها ۶۳ مورد (۱۴/۲۱ درصد) *استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت*، ۴۷ مورد (۷۷/۱۵ درصد) *استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی*، ۴۶ مورد (۴۴/۱۵ درصد) *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، ۳۸ مورد (۷۵/۱۲ درصد) *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه*، ۲۳ مورد (۷۲/۷ درصد) *استرپتوکوکوس یوبریس*، ۲۵ مورد (۸/۳۹ درصد) سایر *استرپتوکوک‌ها*، ۴۵ مورد (۱/۱۵ درصد) *اشرشیا کلی*، شش مورد *کلبسیلا پنومونیه* و پنج مورد (۶۸/۱ درصد) *پزودوموناس آئروژینوزا* جدا گردید. براساس این نتایج می‌توان گفت که ورم پستان ضایعات گسترده‌ای را در رابطه با کاهش تولید و کیفیت شیر ایجاد می‌کند. از سوی دیگر، مصرف شیر خام ورم پستانی و تهیه محصولات لبنی از آن می‌تواند برای انسان خطرناک باشد (۱۶). در این راستا در مطالعه‌ای که توسط Munoz و همکاران در سال ۲۰۰۷ در آمریکا در ارتباط با ماستیت بالینی در خوراک، آب و مدفوع گاوهای شیری مبتلا به ورم پستان با استفاده از روش مولکولی PCR انجام شد، *کلبسیلا پنومونیه* در هشت گاو شناسایی گردید و این نتیجه حاصل شد که غلظت یک‌سویه تنها می‌تواند انتقال مسمومیت ارگانیسم یا قرارگرفتن در معرض چند گاو را به منبع نقطه محیطی نشان دهد. در این مطالعه پس از اجرای اقدامات مداخله‌ای که پیشگیری از انتقال از طریق دستگاه شیردوشی و نیز بهبود بهداشت محیط بود، هیچ مورد جدیدی مشاهده نگردید. شایان ذکر است که تنوع گونه‌های *کلبسیلا* به‌طور معناداری در جدایه‌ها از نمونه‌های مدفوع، خوراک و آب نسبت به جدایه‌های نمونه‌های شیر، بیشتر بود (۱۷).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که عوامل باکتریایی، نقش اصلی و اساسی را در ورم پستان گاوهای شیرده در نقاط مختلف دنیا ایفا می‌کنند که با توجه به شرایط آب و هوایی، نوع عامل ایجادکننده ورم پستان در گاوها تا حدی متفاوت می‌باشد. یکی از پاتوژن‌های فرصت‌طلب باکتریایی مهم در ایجاد عفونت در دام، *کلبسیلا پنومونیه* است که به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دامی، جایگاه سوم را در بیماری ورم پستان گاوهای شیری به خود اختصاص داده است؛ از این رو امید است که تشخیص و بررسی این عوامل باکتریایی مؤثر در ایجاد ورم پستان از طریق ارائه برنامه‌ای ملی به‌منظور کنترل و پیشگیری از این امر و در نهایت کمک به کاهش خسارات بهداشتی و اقتصادی ناشی از این بیماری پرهزینه نقش داشته باشد.

حمایت مالی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده و با حمایت مالی حوزه پژوهشی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌ها با هماهنگی فارم‌های مورد مطالعه و با رضایت کامل دام‌داران جمع‌آوری گردیدند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و مقاله با اطلاع و هماهنگی نویسندگان آن ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در راستای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016; 80(3):629-61.
2. Heidary M, Nasiri MJ, Dabiri H, Tarashi S. Prevalence of drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Iran: a review article. Iran J Public Health. 2018; 47(3):317-26.
3. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. FEMS Microbiol Rev. 2019; 43(2):123-44.
4. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017; 41(3):252-75.
5. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:4.
6. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. Microb Genom. 2016; 2(8):e000073.
7. Feizabadi MM, Raji N, Delfani S. Identification of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 capsular types by PCR and quellung test. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(9):e7585.
8. Mohammad SM, AskariBadouei M, Gorji DM, Daneshvar M, Koochakzadeh A. A study on the clinical Coliform mastitis of Holstein cows on Garmsar suburban dairy farms. Vet Res. 2012; 8(2):137-49. [in Persian]
9. Schukken YH, Barkema HW, Lam TJ, Zadoks RN. Improving udder health on well managed farms: mitigating the perfect storm. International Conference on the Mastitis Control from Science to Practice. Haque. 2008; 10(2):21-35.
10. Bradley AJ, Green MJ. A study of the incidence and significance of inframammary enter bacterial infections acquired during the dry period. J Dairy Sci. 2000; 83(9):1957-65.
11. Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer. Int J Food Microbiol. 2008; 125(3):230-5.
12. Tavakol M, Momtaz H. Molecular characterization of serotypes and capsular virulence genes in cps gen group of *Klebsiella pneumonia* isolated from Tehran hospitals. J Microbial World. 2017; 10(1):18-25. [in Persian]
13. Munoz MA, Ahlström C, Rauch BJ, Zadoks RN. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. J Dairy Sci. 2006; 89(9):3425-30.
14. Firouzi R, Rajaian H, Tabaee IM, Saeedzadeh A. In vitro antibacterial effects of marbofloxacin on microorganisms causing mastitis in cows. J Vet Res. 2010, 65(1):51-5.
15. Saleki K, Moradi H. Bacterial agents of mastitis in dairy cow farms in Ilam city. Sci J Ilam Univ Med Sci. 2013; 20(4):88-95. [in Persian]
16. Sharififar M, Mohsenzadeh M, Fallahrad A. Health evaluation and infection rates of cows with oram minnie in a number of industrial dairy farms of Mashhad. Milk Health Sem. 2009; 12(22):1-2. [in Persian]
17. Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH, Zadoks RN. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. J Clin Microbiol. 2007; 45(12):3964-71.

Volume 22, Issue 71, Autumn 2019, Pages: 11-18

Original Article

Detection of Capsular Types in Klebsiella Pneumoniae Strains isolated from Bovine Mastitis

Fereshteh Mahmoudi[1], Hassan Momtaz[2*]

[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Professor, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 06 July 2019 **Accepted:** 08 August 2019

Abstract

Introduction: Mastitis is one of the most common diseases in dairy cows which causes irreparable damages to the livestock industry in Iran and other regions worldwide. *Klebsiella pneumonia* based on K capsular antigen include serotypes, such as K1, K2, K5, K54, and K57. The aim of this study was to detect this bacterium in clinical and subclinical mastitis cases of cows and determine its common capsular serotypes.

Materials and Methods: In this study, milk samples were collected from 100 lactating cows with mastitis from a large dairy farm in Chaharmahal and Bakhtiari in the second half of 2017. *Klebsiella pneumonia* strains were isolated after microbial culture and molecular confirmation. The presence of K capsular antigens in these isolates was assessed using Polymerase Chain Reaction method.

Results: Out of 100 samples, 20 samples (20%) were found infected with *Klebsiella pneumonia* using microbial culture and 16S-23S ITS gene tracing. The frequency of capsular antigens *K1*, *K2*, *K5*, *K54*, and *K57* were 0.8%, 2.4%, 0, 1.2%, and 0.4% respectively. Moreover, the capsular antigen *K2* with a frequency of 2.4% and *K5* with a frequency of 0% had the highest and lowest frequency, respectively. The data were analyzed using SPSS 21 AND EXCEL through the chi-square test with a 95% confidence interval.

Conclusion: According to the results, *Klebsiella pneumonia* bacteria had a low frequency in the samples of the present study. Therefore, it is hoped that the diagnosis and evaluation of these bacterial agents which lead to the effective development of mastitis control and prevent *Klebsiella pneumonia* by providing a national program, thereby reducing the costs of this disease.

Keywords: Capsule antigens, *Klebsiella pneumonia*, Mastitis, Polymerase chain reaction

Corresponding Author: Hassan Momtaz, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Tel: 03833361064; Email: hamomtaz@yahoo.com; hamomtaz@iaushk.ac.ir