نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۴؛ ۱۹(۲): ۲۵-۳۵.
http://doi.org/10.22034/ijvcs.2026.14940.1095

تشخیص *Streptococcus dysgalactiae*، *Candida albicans* و *Cryptococcus neoformans* با استفاده از PCR در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان

مهدیه صیانتی[۱]، علی کدیور[۲*]، سمیه شاهرخ شهرکی[۳]، اعظم مختاری[۳]، زهرا همتی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

دریافت: ۲۹ بهمن‌ماه ۱۴۰۴ **پذیرش:** ۳۱ اردیبهشت‌ماه ۱۴۰۵

چکیده

ورم پستان یک بیماری شایع و خسارت‌بار در گاوهای شیری است. گونه‌های استرپتوکوک، به‌ویژه (*Streptococcus dysgalactiae*)، از علل اصلی باکتریایی این بیماری هستند. ورم پستان قارچی نیز می‌تواند به‌ویژه در محیط‌ها یا سیستم‌های شیردوشی غیربهداشتی رخ دهد. گونه‌های *Candida* شایع‌ترین قارچ‌های جدا شده در موارد ورم پستان گاو هستند. علاوه بر این، گونه‌های Cryptococcus نیز به‌عنوان عوامل ایجادکننده ورم پستان در گاو شناخته شده‌اند. در این مطالعه، از PCR برای ارزیابی فراوانی سه پاتوژن ایجادکننده ورم پستان در گاو شامل *S. dysgalactiae*، *Candida albicans* (*C. albicans*) و Cryptococcus *neoformans* (*C. neoformans*) در موارد بالینی و تحت بالینی ورم پستان استفاده شد. در مجموع ۱۰۰ نمونه شیر از گاوهایی که مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی تشخیص داده شدند، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل برای استخراج DNA مورداستفاده قرار گرفت. سپس PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر، ۳ نمونه (۳ درصد)، ۴ نمونه (۴ درصد) و ۱ نمونه (۱ درصد) به ترتیب با استفاده از روش PCR از نظر وجود اسیدنوکلئیک *S. dysgalactiae*، *C. albicans* و *C. neoformans* مثبت بودند. موارد مثبت *S. dysgalactiae* همگی مربوط به ورم پستان‌های تحت بالینی و موارد مثبت *C. albicans* و *C. neoformans* همگی مربوط به ورم پستان‌های بالینی بودند. باتوجه‌به مقاومت ورم پستان قارچی در برابر درمان‌های مرسوم و خطرات قابل‌توجه آن برای صنعت لبنیات، نتایج این تحقیق به تعیین فراوانی عفونت و در نتیجه به‌کارگیری پروتکل‌های مدیریتی هدفمند کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ورم پستان، گاو، باکتری، قارچ، تشخیص مولکولی

مقدمه

ورم پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های گاوهای شیری است که اثرات منفی قابل‌توجهی بر تولید شیر و سلامت دام دارد. این بیماری شامل التهاب بافت پارانشیمی غده پستانی است که منجر به تغییرات فیزیکی و شیمیایی در شیر می‌شود. همچنین باعث التهاب در بافت پستان می‌شود و منجر به علائمی مانند تورم، قرمزی، درد و افزایش دما در ناحیه آسیب‌دیده می‌شود. ورم پستان تحت بالینی باعث کاهش تولید شیر بدون علائم بالینی می‌شود و این امر به صنعت لبنیات بسیار آسیب می‌رساند (۱۱). ورم پستان در گاوهای شیری در درجه اول توسط عوامل باکتریایی و قارچی ایجاد می‌شود. شرایط بهداشتی نامناسب مانند استفاده از دستگاه‌های شیردوشی آلوده یا دستگاه‌هایی با مشکلات مکانیکی، عدم رعایت اصول بهداشتی مناسب در هنگام

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: kadivar.ali@sku.ac.ir

شیردوشی و شرایط غیربهداشتی محل نگهداری گاوها، شرایطی را برای شیوع عوامل عفونی ایجادکننده ورم پستان در گله ایجاد می‌کند (۳). از جمله باکتری‌های اصلی مسئول ورم پستان در گاوهای شیری، گونه‌های استرپتوکوک، از جمله *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) و *Streptococcus uberis* (*S. uberis*) هستند. استرپتوکوک‌ها کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که به‌صورت زنجیره‌ای یا جفتی تقسیم می‌شوند. اکثر استرپتوکوک‌ها آنزیم‌های کاتالاز و اکسیداز تولید نمی‌کنند و بی‌هوازی‌های اختیاری هستند (۲۶). استرپتوکوک دیسگالاکتیه متعلق به گروه C لانسفیلد، یک عامل باکتریایی مهم است که باعث ورم پستان در گاوهای شیری می‌شود. اگرچه اکثر سویه‌های *S. dysgalactiae* غیر همولیتیک هستند، اما برخی موارد استثنا، همولیز آلفا را نشان می‌دهند. این باکتری برای آزمایش Christine–Atkinson–Munch–Peterson (CAMP) منفی است و اسکولین را تجزیه نمی‌کند. همچنین، می‌تواند هم در محیط و هم در میزبان زنده بماند و از نظر محیطی یا مسری بودن، آن را به‌عنوان یک پاتوژن واسط طبقه‌بندی می‌کند (۲۹).

ورم پستان قارچی در گاوهای شیری کمتر از ورم پستان باکتریایی شایع است. قارچ‌ها در طبیعت ارگانیسم‌های ساپروتروفیک هستند و درمان ناکافی با آنتی‌بیوتیک یا در برخی شرایط استفاده بیش از حد و مکرر از آنتی‌بیوتیک‌ها، شیردوشی با ماشین‌های شیردوشی یا دست‌های آلوده و استفاده از پمادها یا کاتترهای داخل پستانی آلوده می‌تواند باعث عفونت‌های قارچی شود (۷). شایع‌ترین قارچ جدا شده از موارد ورم پستان در گاوهای شیری، گونه‌های *Candida* هستند که معمولاً در محیط طبیعی زندگی گاوها یافت می‌شوند. درحالی‌که *C. albicans* گونه غالب در جنس کاندیدا است، وقوع سایر گونه‌های کاندیدا به‌تدریج در حال افزایش است (۹, ۲۵). مطالعات منتشر شده کمی در مورد اپیدمیولوژی ورم پستان کریپتوکوکی وجود دارد. جداسازی *C. neoformans* از شیر یک مورد ورم پستان بز برای اولین‌بار توسط پال و راندهاوا در سال ۱۹۷۶ نشان داده شد (۱۹). گونه‌های کریپتوکوکوس - مخمرهای محیطی کپسول‌دار و فراگیر- باعث بیماری در حیوانات اهلی، از جمله ورم پستان در گاو می‌شوند. بااین‌وجود، نقش آن‌ها در ورم پستان گاو همچنان کمتر موردمطالعه قرار گرفته است، زیرا بیشتر تحقیقات بر روی پاتوژن‌های باکتریایی متمرکز شده‌اند (۱۴).

روش‌های تشخیصی مرسوم برای عفونت‌های قارچی، شامل رویکردهای مستقیم و غیرمستقیم، اغلب فاقد دقت کافی هستند؛ بنابراین، محققان به دنبال آزمایش‌های دقیق‌تر، سریع، عملی‌تر و قابل‌اعتمادتری هستند که حساسیت و ویژگی بالایی برای تشخیص عفونت‌های قارچی ارائه دهند.

هدف از این مطالعه، استفاده از روش PCR برای ارزیابی فراوانی سه پاتوژن ورم پستان شامل *S. dysgalactiae*، *C. albicans* و *C. neoformans* در نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی بود.

مواد و روش کار

بین دی ۱۳۹۹ تا فروردین ۱۴۰۰، ۱۰۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی (۸ رأس) و تحت بالینی (۹۲ رأس) از برخی از مزارع گاو شیری استان چهارمحال‌وبختیاری، شهرستان شهرکرد جمع‌آوری شدند. نمونه‌های شیر برای ورم پستان بالینی از گاوهایی که حداقل یکی از این علائم را نشان می‌دادند، گرفته شد. ۱- وجود ناهنجاری‌های قابل‌مشاهده در شیر، مانند تغییر رنگ، چرک یا لخته. ۲- علائم ناهنجاری‌های پستان، از جمله تورم، قرمزی، درد یا افزایش گرما. جمع‌آوری به طور خاص از کارتیه‌ای که علائم عفونت را نشان می‌داد، انجام شد.

نمونه‌های شیر برای ورم پستان تحت بالینی از کارتیه‌های پستانی که در آزمایش California Mastitis Test (CMT) نتایج مثبتی داشتند، جمع‌آوری شدند. تقریباً ۵ میلی‌لیتر شیر از هر کارتیه در فنجان مربوطه ظرف CMT ریخته شد تا آزمایش انجام شود. ۵ میلی‌لیتر محلول CMT

(KerbaTEST، KERBL، آلمان) به هر فنجان اضافه شد. سپس مخلوط با تکان‌دادن آرام ظرف به مدت حدود ۱۰ ثانیه هم زده شد تا از اختلاط کامل شیر و محلول CMT اطمینان حاصل شود. واکنش CMT هر کارتیه متعاقباً به طور جداگانه ارزیابی شد. نتایج به این شرح تفسیر شدند: منفی: بدون تغییر در ظاهر مخلوط، Trace: تشکیل لخته کوچک و موقت، ۱+: محلول غلیظ با تشکیل ژل، ۲+: ایجاد محلول بسیار غلیظ با تشکیل ژل، ۳+: ژل غلیظ چسبیده به ظرف. نمونه‌های شیر از کارتیه‌هایی که ورم پستان تحت بالینی با نمره CMT ۱+ یا بالاتر نشان می‌دادند، جمع‌آوری شد.

قبل از جمع‌آوری نمونه، گاوها هیچ درمان آنتی‌بیوتیکی دریافت نکرده بودند. برای گرفتن نمونه‌های شیر، ۳ دوشش اول دور ریخته شد. پس از تمیز کردن نوک پستان با پنبه آغشته به اتانول ۷۰ درصد، نمونه در یک ظرف استریل جمع‌آوری شد. برای گاوهایی که فقط یک کارتیه مبتلا داشتند، نمونه از همان کارتیه گرفته شد. برای گاوهایی که بیش از یک کارتیه مبتلا داشتند، شیر کارتیه‌های مبتلا به‌صورت مخلوط در یک ظرف جمع‌آوری شد.

در آزمایشگاه، نمونه‌های شیر به مدت ۴۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل برای استخراج DNA استفاده شد. کیت استخراج DNA (DNP™، سیناکلون، ایران) طبق پروتکل سازنده برای استخراج استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز به ۵۰۰ میکرولیتر رسوب شیر اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر پروتئاز اضافه شد و مخلوط قبل از انکوباسیون در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه کاملاً مخلوط شد. پس از آن، ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز به مخلوط اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شد. متعاقباً، ۳۰۰ میکرولیتر بافر رسوبی اضافه شد و به دنبال آن ۵ ثانیه ورتکس انجام شد و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی با دقت دور ریخته شد و پس از آن ۱ میلی‌لیتر بافر شستشو اضافه شد. مخلوط به مدت ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل با هم زدن ملایم در ۵۰ میکرولیتر بافر شستشو دوباره به حالت تعلیق درآمد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا فرایند حل شدن تسهیل شود. ترکیبات حل نشده با سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه حذف شدند و مایع رویی حاصل که حاوی DNA بود جمع‌آوری شد. DNA های استخراج شده تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

از روش جوشاندن برای استخراج DNA از جدایه‌های *C. albicans* (ATCC:12388)، *S. dysgalactiae* (ATCC:14053) و *C. neoformans* (ATCC:13690) که به‌عنوان نمونه‌های کنترل مثبت در نظر گرفته شدند، استفاده شد. با حل‌کردن ۳ تا ۵ کلنی از هر جدایه در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، سوسپانسیون یکنواختی تهیه شد. سپس سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. پس از جوشاندن، سوسپانسیون‌ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی حاصل به‌عنوان DNA کنترل مثبت استفاده شد.

برای انجام PCR، هر واکنش در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED (Ampliqon، دانمارک)، ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رو به جلو و معکوس (هر دو با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. برنامه زمانی و دمایی برای PCR میکروارگانیسم‌های موردمطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. مشخصات پرایمرهای مورداستفاده نیز در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- برنامه زمانی و دمایی PCR برای *S. dysgalactiae*، *C. albicans* و *C .neoformans*.

مرحله PCR	میکروارگانیسم	دمای واکنش (°C)	مدت‌زمان	تکرار
واسرشت اولیه	*S.dysgalactiae*	۹۵	۵ دقیقه	۱
	C.albicans	۹۵	۵ دقیقه	۱
	C.neoformans	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشت	*S.dysgalactiae*	۹۵	۳۰ ثانیه	۴۰
	C.albicans	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
	C.neoformans	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۰
اتصال پرایمر	*S.dysgalactiae*	۵۰	۳۰ ثانیه	۴۰
	C.albicans	۵۷	۶۰ ثانیه	۳۵
	C.neoformans	۶۰	۳۰ ثانیه	۳۰
گسترش	*S.dysgalactiae*	۷۲	۳۰ ثانیه	۴۰
	C.albicans	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۵
	C.neoformans	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۰
گسترش نهایی	*S.dysgalactiae*	۷۲	۵ دقیقه	۱
	C.albicans	۷۲	۴ دقیقه	۱
	C.neoformans	۷۲	۵ دقیقه	۱

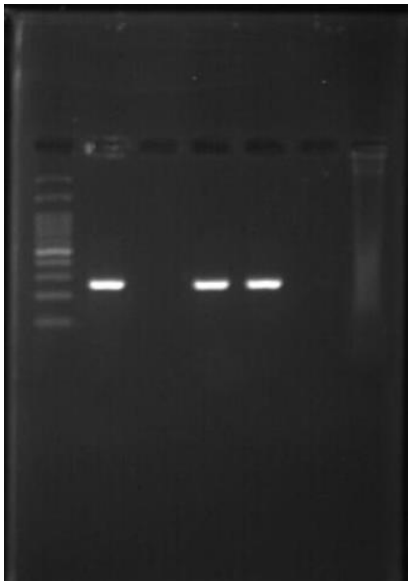
جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مورداستفاده

میکروارگانیسم	نام ژن	توالی آغازگرهای رو به جلو و معکوس	طول محصول (bp)	منبع
S. dysgalactiae	STRD- Dy	F: 5´-GAACACGTTAGGGTCGTC-3´ R:5´-AGTATATCTTAACTAGAAAAACTATTG-3´	۲۶۴	(۲۰)
C. albicans	RNAr	´F: 5´-TGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG-3 R: 5´-AGATCATTATGCCAACATCCTAGGTTAAA-3´	۱۷۵	(۱۸)
C. neoformans	STR1	F: 5′-GAGATTCGGCAGGAAGAAGC-3′ R: 5-′CGTAAGGGATGACGAAAAGGTA-3′	۲۷۴	(۱۰)

هر اجرای PCR شامل نمونه‌های کنترل مثبت با *S. dysgalactiae*، *C. albicans* و *C. neoformans* بود و هر نمونه ناشناخته برای هر سه میکروارگانیسم با استفاده از PCR آزمایش شد. علاوه بر این، برای اطمینان از عدم وجود آلودگی، هر اجرای PCR شامل یک کنترل بدون الگو (NTC) بود که در آن به جای DNA، آب مقطر استریل اضافه می‌شد. محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جدا شده و با استفاده از یک ترانس ایلومیناتور (UVtrch-BTs-20-M) در زیر نور **UV** مشاهده شدند.

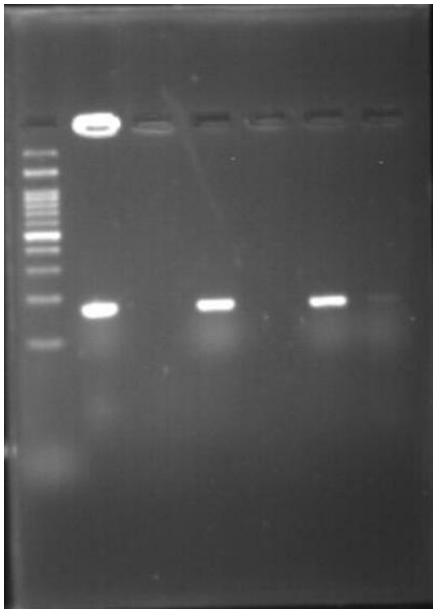
نتایج

شکل ۱ الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR از *S. dysgalactiae* را نشان می‌دهد که منجر به تولید یک قطعه ۲۶۴ جفت بازی شد.



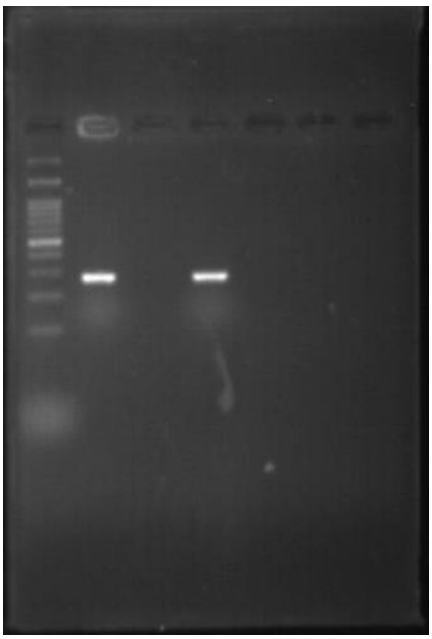
شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز از محصولات PCR برای *S. dysgalactiae*. طول قطعه ۲۶۴ جفت باز است. از چپ به راست: ردیف اول ladder ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ردیف دوم کنترل مثبت (قطعه ۲۶۴ جفت بازی)؛ ردیف سوم کنترل بدون الگو؛ ردیف‌های چهارم و پنجم نمونه‌های مثبت؛ ردیف‌های ششم و هفتم نمونه‌های منفی.

شکل ۲ الکتروفورز محصولات PCR *کاندیدا آلبیکنس* روی ژل آگارز را نشان می‌دهد که منجر به تولید یک قطعه ۱۷۵ جفت بازی شد.



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز از محصولات PCR برای *C. albicans*. طول قطعه ۱۷۵ جفت باز است. از چپ به راست، ردیف اول ladder ۱۰۰ جفت بازی؛ ردیف دوم کنترل مثبت (قطعه ۱۷۵ جفت بازی)؛ ردیف سوم کنترل بدون الگو؛ ردیف‌های چهارم، ششم و هفتم نمونه‌های مثبت؛ ردیف پنجم نمونه منفی.

شکل ۳ الکتروفورز محصولات PCR از *C. neoformans* را در ژل آگارز نشان می‌دهد که منجر به تولید یک قطعه ۲۷۴ جفت بازی شد. ژل شامل نمونه کنترل مثبت، نمونه کنترل بدون الگو و نمونه‌های شیر مثبت و منفی است.



شکل ۳- ژل الکتروفورز شده از محصولات PCR برای *C. neoformans*. طول قطعه تکثیر شده ۲۷۴ جفت باز است. از چپ به راست، ردیف اول ladder ۱۰۰ جفت بازی؛ ردیف دوم کنترل مثبت (قطعه تکثیر شده ۲۷۴ جفت بازی)؛ ردیف سوم کنترل بدون الگو؛ ردیف چهارم نمونه مثبت و ردیف‌های پنجم، ششم و هفتم نمونه‌های منفی.

در این مطالعه، از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر، به ترتیب ۳ نمونه (۳٪)، ۴ نمونه (۴٪) و ۱ نمونه (۱٪) با استفاده از روش PCR برای *S. dysgalactiae*، *C. albicans* و *C. neoformans* مثبت بودند. تمام موارد مثبت *S. dysgalactiae* مربوط به ورم پستان‌های تحت بالینی بودند، درحالی‌که تمام موارد مثبت *C. albicans* و *C. neoformans* مربوط به ورم پستان‌های بالینی بودند.

بحث

ورم پستان از جمله شایع‌ترین و خسارت‌بارترین بیماری‌های گاوهای شیری است. در سطح جهانی، میزان بروز ورم پستان گاوی معمولاً سالانه بین ۳۰ تا ۵۰ درصد از کل گاوها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲, ۲۲). ورم پستان بار مالی قابل‌توجهی را تحمیل می‌کند و تخمین زده شده است که این بیماری سالانه حدود ۱۲۴ یورو به‌ازای هر گاو ضرر مالی داشته باشد. این به معنای تأثیرات اقتصادی قابل‌توجهی است که بر اساس برآوردها حدود ۵۰۰ میلیون یورو در آلمان، ۳ میلیارد یورو در سراسر اتحادیه اروپا و ۱۲۵ میلیارد یورو در سراسر جهان در هر سال است (۲). عوامل بیماری‌زای ورم پستان به دو گروه مسری و محیطی طبقه‌بندی می‌شوند. عوامل بیماری‌زای مسری برای ماندگاری در بدن میزبان تخصص دارند و عمدتاً در طول فرایند شیردوشی از گاوی به گاو دیگر منتقل می‌شوند. در مقابل، عوامل بیماری‌زای

محیطی در خارج از میزبان زنده می‌مانند و معمولاً در محیط میکروبی اطراف گاو وجود دارند (۲). همان‌طور که قبلاً ذکر شد، طبقه‌بندی *S. dysgalactiae* به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای محیطی یا مسری هنوز مشخص نیست. این ابهام از ظرفیت آن برای ماندگاری هم در داخل میزبان و هم در محیط خارجی ناشی می‌شود و در نتیجه به‌عنوان یک پاتوژن واسطه در نظر گرفته می‌شود (۲۹).

انواع ورم پستان‌های استرپتوکوکی توزیع یکسانی در سراسر جهان ندارند و گونه‌های استرپتوکوک که نقش غالب در ایجاد ورم پستان استرپتوکوکی دارد، در مناطق جغرافیایی مختلف متفاوت هستند. به‌عنوان‌مثال، در آفریقا و آسیا، *S. agalactiae* مسئول اکثر موارد ورم پستان است. در آمریکای شمالی، *S. uberis* و *S. dysgalactiae* پاتوژن‌های اصلی استرپتوکوکی هستند که هر کدام با فراوانی‌های قابل مقایسه‌ای رخ می‌دهند. برعکس، در استرالیا، نیوزیلند و اروپا، *S. uberis* عامل اصلی ورم پستان استرپتوکوکی است (۱۳). در این مطالعه، ۳ درصد از نمونه‌ها با استفاده از PCR برای *S. dysgalactiae* مثبت شدند. عوامل مختلف مربوط به میزبان و محیط بر حساسیت گاو به ورم پستان استرپتوکوکی و در نتیجه شیوع آن تأثیر می‌گذارند، از جمله سن، مرحله شیردهی، تعداد زایمان و بهداشت شیوه‌های شیردوشی (۱). گاوهای مسن‌تر و گاوهایی که تعداد زایمان‌های بیشتری دارند، نسبت به گاوهای جوان‌تر، میزان ابتلا به ورم پستان استرپتوکوکی بیشتری دارند. احتمال ابتلا به ورم پستان استرپتوکوکی برای گاوها در اوایل و اواخر دوره شیردهی در مقایسه با گاوهایی که در مراحل میانی شیردهی هستند بالاتر است (۱). این افزایش حساسیت در اوایل دوره شیردهی می‌تواند به سرکوب سیستم ایمنی در اوایل شیردهی مربوط باشد که ناشی از افزایش استرس اکسیداتیو همراه با دفاع آنتی‌اکسیدانی ناکافی در این دوران است (۲).

در میان استرپتوکوک‌های مولد ورم پستان، تنها میزان بروز *S. dysgalactiae* در مطالعه حاضر ارزیابی شد. تعیین میزان بروز ورم پستان استرپتوکوکی، نیاز به بررسی سایر استرپتوکوک‌های مهم در این زمینه، مانند *S. agalactiae* و *S. uberis* دارد. روش تشخیصی نیز به طور قابل‌توجهی بر میزان گزارش شده از عوامل بیماری‌زای ورم پستان تأثیر می‌گذارد. در این مورد، کشت باکتریایی از رایج‌ترین روش‌ها در هر دو محیط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای است. بااین‌حال، این روش در حدود ۳۰ درصد از موارد قادر به شناسایی عوامل بیماری‌زا نیست؛ زیرا فقط باکتری‌های زنده را تشخیص می‌دهد. در نتیجه، مطالعات مختلف از روش‌های مولکولی استفاده کرده‌اند که سرعت و حساسیت بیشتری را برای تشخیص عوامل بیماری‌زای ورم پستان دارند. تکنیک‌های mass spectrometry، PCR، ژنوتیپینگ و روش‌های microarray به طور گسترده برای تشخیص مستقیم عوامل عفونی استفاده شده‌اند (۶).

در مطالعه‌ی Diana و همکاران، محققان یک روش duplex droplet digital PCR را برای تشخیص هم‌زمان *S. uberis* و *S. dysgalactiae* در نمونه‌های شیر برای تشخیص عفونت‌های داخل پستانی گاو راه‌اندازی کردند. این روش همچنین برای تعیین کمیت این عوامل بیماری‌زا استفاده شد و نتایج آن با دو روش end ponit PCR و کشت مقایسه شد. در این مطالعه، تمام نمونه‌های شیر مزرعه (۱۲/۱۲) که کشت مثبت برای S. dysgalactiae داشتند، با روش end point PCR برای این پاتوژن منفی بودند و تعداد رونوشت‌ها در میکرولیتر به‌دست‌آمده توسط روش dddPCR نیز نشان داد که این مقدار در این‌ها کمتر از ۳۴۰ CFU/mL بود. علاوه بر این، ۸۷/۵ درصد از آن نمونه‌ها (۱۱/۱۲) با روش end point PCR برای S. uberis مثبت بودند و از رونوشت‌ها در میکرولیتر به‌دست‌آمده از روش ddPCR، مشخص شد که این نمونه‌ها تعداد زیادی S. uberis دارند. در این مطالعه، مقادیر CFU/mL تخمین زده شده بر اساس تعداد رونوشت‌ها در میکرولیتر به‌دست‌آمده از طریق dddPCR، همبستگی قوی با CFU/mL مشاهده شده از کشت داشت. حساسیت این روش برای *S. uberis* و *S. dysgalactiae* به ترتیب ۸۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود. اختصاصیت برای هر دو ۱۰۰ درصد

بود. آنها پیشنهاد کردند که به‌ویژه در نمونه‌های شیر با بار باکتریایی کم یا دفع متناوب، duplex droplet digital PCR روشی مناسب برای تشخیص عوامل بیماری‌زا است (۴). در مطالعه‌ی دیگری توسط Klassen و همکاران، حساسیت و ویژگی دو کیت تجاری ارزیابی شد. این کیت‌ها *Staphylococcus aureus*، *S. agalactiae* و *S. dysgalactiae* را در نمونه‌های شیر جمع‌آوری‌شده با استفاده از multiplex real-time PCR تشخیص می‌دهند. آنها همچنین ارزیابی کردند که چگونه تعداد گاوهای مثبت از نظر باکتریولوژیکی و اندازه‌ی مخزن بر احتمال تشخیص در یک مخزن تأثیر می‌گذارد. میانگین حساسیت تخمینی کیت‌های PCR برای گونه‌های استرپتوکوک از ۷۷/۵ درصد تا ۸۵/۶ درصد متغیر بود، درحالی‌که برای کشت باکتریولوژیک، از ۷۳/۷ درصد تا ۷۹/۲ درصد متغیر بود. میانگین ویژگی برای کیت‌های PCR بین ۹۳/۶ درصد تا ۹۹/۲ درصد و برای کشت باکتریولوژیک، بین ۹۶/۹ درصد تا ۹۷/۴ درصد متغیر بود. علاوه بر این، افزایش تعداد گاوهای مثبت از نظر کشت باکتریولوژیک در هر گروه، احتمال تشخیص را افزایش داد (۱۶).

بیشتر قارچ‌های عامل ورم پستان قارچی، ساپروفیت‌هایی هستند که روی بسترهای طبیعی مختلف رشد می‌کنند و می‌توانند حیوانات آسیب‌پذیر را آلوده کنند. عفونت‌های قارچی ممکن است از طریق کانال آسیب‌دیده سرپستانک یا از طریق محصولات ضدباکتری آلوده که به‌صورت داخل پستانی تجویز می‌شوند، وارد شوند. علاوه بر این، شرایط غیربهداشتی و سرپستانک‌های آلوده نیز می‌توانند به‌عنوان منبع عفونت عمل کنند. گونه‌های کاندیدا، قارچ اصلی مرتبط با ورم پستان قارچی در حیوانات شیری هستند (۲۱, ۲۷). در مطالعه حاضر، ۴ درصد از نمونه‌ها با استفاده از روش PCR از نظر وجود *C. albicans* مثبت بودند.

Wawron و همکاران (۲۳)، ۲۱۲۲ نمونه شیر را در مناطق Lublin و Warsaw مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌ها از گاوهایی با ورم پستان بالینی و تحت بالینی بودند و روی محیط‌های آگار و Sabouraud حاوی کلرامفنیکل کشت داده شدند. از بین تمام پاتوژن‌های جدا شده، ۷/۰۷ درصد قارچ‌ها از جمله کاندیدا (شایع‌ترین)، تریکوسپورون، رودوتورولا و کریپتوکوکوس بودند. گونه‌های اصلی کاندیدا شناسایی شده *C. krusei*، *C. kefyr* و *C. lusitaniae* بودند (۲۸). Sonmezو Erbas، مطالعه‌ای را برای شناسایی گونه‌های کریپتوکوکوس در نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی انجام دادند. جداسازی و شناسایی در این مطالعه با استفاده از روش کشت انجام شد. بررسی آن‌ها نشان داد که حدود ۲۵ درصد از نمونه‌های مورد بررسی به گونه‌های کاندیدا آلوده بودند که فراوانی بالایی است (۲۴).

در مطالعه‌ای که توسط Pachauri و همکاران در ناحیه ماتورا در هند انجام شد، کاندیدا آلبیکنس در ۳۰ درصد و ۲۵ درصد از موارد ورم پستان بالینی و تحت بالینی گاو به ترتیب شناسایی شد (۲۳). Khalaf و همکاران، ۱۳۸ نمونه شیر از گونه‌های بز، گوسفند، گاومیش و گاو اخذ شد و نمونه‌ها برای شناسایی برخی گونه‌های کاندیدا مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه و بر اساس بررسی قارچ‌شناسی، وجود مخمر در درصدهای مختلفی از نمونه‌های شیر تأیید شد که شامل ۴۷/۲ درصد در شیر گاو، ۳۲/۶ درصد در شیر بوفالو، ۸/۳ درصد در شیر بز و ۶/۷ درصد در شیر گوسفند بود. درصد کلی مخمر جدا شده از تمام نمونه‌های شیر ۳۱/۲ درصد بود. گونه‌های کاندیدای جدا شده با استفاده از محیط کشت کروم آگار و روش بیوتایپینگ (API 20 C AUX) عبارت بودند از: *C. albicans* (۱۱/۶ درصد)، *C. glabrata* (۵/۸ درصد)، *C. tropicalis* (۵/۱ درصد) و *C. krusei* (۲/۹ درصد) (۱۵). مطالعات دیگری نیز در مورد جداسازی گونه‌های کاندیدا از شیر ورم پستان در گاوها انجام شده است. در مطالعه‌ای توسط Dworecka-Kaszak و همکاران، ۵۵ جدایه متعلق به جنس کاندیدا از ۶۶ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان جدا شدند. از این‌ها، ۲۵ مورد *Candida parapsilosis*، ۱۵ سویه *Candida krusei*، ۵ مورد

Candida lusitaniae، ۳ مورد *Candida guilliermondii*، ۱ مورد *Candida tropicalis* و ۱ مورد *Candida albicans* بودند (۸). در مطالعه‌ای توسط Krukowski و همکاران، *C. kefyr* ، *Candida cirferi* و *C. krusei*، شایع‌ترین گونه‌های کاندیدای جدا شده از نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بودند (۱۷).

در مطالعه Du و همکاران ۴۸۲ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی در چهار گله اخذ شد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی عوامل بیماری‌زای ورم پستان با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی و همچنین **matrix**-assisted laser desorption ionization-MALDI-) time of flight mass spectrometry TOF MS) بود. در مجموع ۶۰ جدایه از ۹ گونه کاندیدا در ۲۵۶ نمونه شیر یافت شد. *C. krusei* با ۱۴ جدایه و *C. parapsilosis* با ۶ جدایه شایع‌ترین گونه‌ها در گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی بودند. در این مطالعه *C. albicans* شناسایی نشد. سایر گونه‌های یافت شده شامل *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*)، *Candida lipolytica* (*C. lipolytica*) و *Candida lusitaniae* (*C. lusitaniae*) بودند (۵).

در مطالعه حاضر، ۱ درصد از نمونه‌ها با استفاده از PCR از نظر وجود *C. neoformans* مثبت بودند. گونه‌های کریپتوکوکوس در برخی مطالعات به‌عنوان علل بالقوه ورم پستان شناسایی شده‌اند. Kadhim و همکاران، مطالعه‌ای را برای تشخیص گونه‌های کریپتوکوکوس در نمونه‌های شیر انجام دادند. نمونه‌ها از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی جمع‌آوری شدند. در مجموع ۲۷ نمونه به طور تصادفی جمع‌آوری و با استفاده از روش‌های کشت آزمایش شدند که گونه‌های کریپتوکوکوس را در ۲۸/۶ درصد از نمونه‌ها نشان داد. در میان نمونه‌های مثبت، ۶۲/۵ درصد حاوی *C. neoformans*، ۲۵ درصد حاوی *Cryptococcus gattii* (*C. gattii*) و ۱۲/۵ درصد حاوی *Cryptococcus laurentii* (*C. laurentii*) بودند که با استفاده از آگار افتراقی کریپتوکوکوس تعیین شد (۱۴).

در مجموع، این مطالعه فراوانی یک عامل باکتریایی مهم و دو عامل قارچی مهم دخیل در ورم پستان در گاوها را بررسی کرد. نمونه‌ها از گاوهایی با ورم پستان بالینی و تحت بالینی جمع‌آوری شدند و با روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. این روش حساسیت بالایی برای تشخیص عوامل عفونی ورم پستان دارد و به تعیین دقیق‌تر فراوانی این عوامل عفونی کمک می‌کند. باتوجه‌به مقاومت ورم پستان‌های قارچی در برابر درمان‌های مرسوم و خطرات قابل‌توجه آن برای صنعت لبنیات، انجام تحقیقات بیشتر در نواحی مختلف جغرافیایی برای مشخص‌کردن این عوامل عفونی، منجر به شناخت بهتر از میزان نقش این عوامل در ورم پستان در گاو و همچنین نحوه پراکنش جغرافیایی آن‌ها خواهد شد و در به‌کارگیری پروتکل‌های مدیریتی هدفمند برای ورم پستان کمک خواهد کرد. همچنین پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی قطعات تکثیر شده تعیین توالی شوند.

قدردانی و تشکر

نویسندگان از دانشگاه شهرکرد که حمایت مالی این پژوهش را انجام داد قدردانی و تشکر می‌کنند. همچنین نویسندگان مراتب قدردانی خود را از گاودارهایی که ما را در جمع‌آوری نمونه‌ها کمک و حمایت کردند، ابراز می‌کنند.

منابع

1. Amin B, Deneke Y, Abdela N. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of Streptococcus species from small holders dairy farms in and around Haramaya Town, Eastern Ethiopia. Global.J.Med.Res. 2017;17(1):27-38.
2. Cheng WN, Han SG. Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. Asian. Austral. J. Anim. 2020;33(11):1699.
3. Cobirka M, Tancin V, Slama P. Epidemiology and classification of mastitis. Animals. 2020;10(12):2212.

neoformans var. neoformans, Cryptococcus gattii, and hybrids. J.Clin. Mmicrobiol. 2013;51(6):1920-3.

11. Guimarães JL, Brito MA, Lange CC, Silva MR, Ribeiro JB, Mendonça LC, et al. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. Prev.Vet.Med. 2017; 142: 46-50.
12. Ibrahim N. Review on mastitis and its economic effect. CJSR. 2017;6(1):13-22.
13. Kabelitz T, Aubry E, van Vorst K, Amon T, Fulde M. The role of Streptococcus spp. in bovine mastitis. Microorganisms. 2021;9(7):1497.
14. Kadhim MA. Detection of Cryptococcus sp. from clinical and subclinical mastitis in dairy cows and assessment antifungal activity to fluconazole, amphotericin B, and nystatin. DJVS. 2023;1(3):84-98.
15. Khalaf DD, Soliman MM, Mansour AS. Conventional and molecular identification of mycotic mastitis caused by Candida in farm animals. Int. J. Vet. Sci. 2021;10(1):64-68.
16. Klassen A, Dittmar K ,Schulz J, Einax E, Donat K. Estimation of the performance of two real-time polymerase chain reaction assays for detection of Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, and Streptococcus dysgalactiae in pooled milk samples in a field study. J.Dairy.Sci. 2023;106(12):9228-9243.
17. Krukowski H, Tietze M, Majewski T, Różański P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. Mycopathologia. 2001; 150(1): 5-7.
4. Diana L, Traglia G, Diana V ,Calvinho L, Laporta J, Iriarte A, et al. Duplex droplet digital PCR detection of Streptococcus uberis and Streptococcus dysgalactiae, major etiological agents of bovine mastitis. Frontanimsci. 2024;4:1336816.
5. Du J, Wang X, Luo H, Wang Y, Liu X, Zhou X .Epidemiological investigation of non-albicans Candida species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. BMC.Vet.Res. 2018; 14(1):251.
6. Duarte CM, Freitas PP, Bexiga R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. J.Vet.Diagn.Invest. 2015; 27(6):665-72.
7. Dudko P, Winiarczyk S, Majewski P, Antkowiak IR, Pytlewski J, Kurpisz M, et al. The coexistence of several microbial species at the same site of bovine mammary gland parenchyma infection and their mixed infections. Animal.Sci.Genet. 2023;19(4): 29-50.
8. Dworecka-Kaszak B, Krutkiewicz A, Szopa D, Kleczkowski M, Biegańska M. High prevalence of Candida yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland. The Scientific World Journal. 2012; 2012(1):196347.
9. Eldesouky I, Mohamed N, Khalaf D, Salama A, Elsify A, Ombarak R, et al. Candida mastitis in dairy cattle with molecular detection of Candida albicans. Kafkas. Unv.Vet.Fak. 2016;22(3):461-464.
10. Feng X, Fu X, Ling B, Wang L, Liao W, Yao Z. Development of a singleplex PCR assay for rapid identification and differentiation of Cryptococcus neoformans var. grubii, Cryptococcus

Lactic Acid Bacteria: CRC Press; 2024. p. 56-83.

27. Tesfaye B, Matios L, Getachew T, Tafesse K, Abebe O, Letebrihan Y, et al. Study on bovine mastitis with isolation of bacterial and fungal causal agents and assessing antimicrobial resistance patterns of isolated Staphylococcus species in and around Sebeta town, Ethiopia. Afr.J.Microbio.Res. 2019; 13(1): 23-32.
28. Wawron W, Bochniarz M, Piech T. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. BullVetInstPulawy. 2010; 54(2): 201-204.
29. Wente N, Krömker V. *Streptococcus dysgalactiae*—Contagious or environmental? Animals. 2020; 10(11): 2185.
18. Mannarelli B, Kurtzman C. Rapid identification of Candida albicans and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J.Clin.Microbiol. 1998;36(6):1634-41.
19. Pal M, Randhawa H. Caprine mastitis due to Cryptococcus neoformans. Sabouraudia: J. Med .Vet. Mycol. 1976; 14(3): 261-263.
20. Phuektes P, Mansell P, Browning G. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus and streptococcal causes of bovine mastitis. J.Dairy.Sci. 2001; 84(5): 1140-1148.
21. Rawat SVH, Jaiswal V. Isolation of Candida spp. from mastitis milk. Int. J. Livest. Res.; 2020;10: 185-7.
22. Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J.Dairy.Sci. 2017;100(12):10381-97.
23. Sarita Pachauri SP, Puneet Varshney PV, Dash SK, Gupta MK. Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. Vet.World. 2013; 6(7): 393-395.
24. Sonmez M, Erbas G. Isolation and identification of Candida spp. from mastitis cattle milk and determination of antifungal susceptibilities. Int. J. Vet. Sci. 2017; 6(2): 104-107.
25. Taei M, Chadeganipour M, Mohammadi R. An alarming rise of non-albicans Candida species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. BMC.Res.Notes. 2019;12(1):779.
26. Tagg JR, Harold LK, Hale JD, Wescombe PA, Burton JP. Streptococcus: A brief update on the current taxonomic status of the genus.

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2025; 19(2): 25-35.
http://doi.org/ 10.22034/ijvcs.2026.14940.1095

PCR detection of *Streptococcus dysgalactiae*, *Candida albicans*, and *Cryptococcus neoformans* in bovine mastitic milk

Mahdiyeh sianati[1]; Ali Kadivar[2*]; Somaye Shahrokh Shahraki[3]; Azam Mokhtari[3]; Zahra Hemati[3]

1. MSc graduate, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Received: 18 February 2026 ***Accepted***: 21 May 2026

Summary

Mastitis is a frequent and costly disease in dairy cattle. Streptococcus species, especially *Streptococcus dysgalactiae (S. dysgalactiae)*, are major bacterial causes of this condition. Fungal mastitis can also occur, particularly in unsanitary environments or milking systems. Candida species are the most commonly isolated fungi in cases of bovine mastitis. Furthermore, Cryptococcus species have also been recognized as causative agents of mastitis in cattle. In this study, PCR was employed to assess the frequency of three mastitis-causing pathogens in cattle including *S. dysgalactiae*, *Candida albicans (C. albicans)*, and *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) across both clinical and subclinical cases of bovine mastitis. A total of 100 milk samples were obtained from cows diagnosed with both clinical or subclinical mastitis. The samples were centrifuged, and the resulting precipitate was utilized for DNA extraction. Polymerase chain reaction (PCR) was then conducted using specific primers. Out of a total of 100 milk samples, 3 samples (3%) , 4 samples (4%) and 1 sample (1%) were found to be positive for the presence of *S. dysgalactiae*, *C. albicans* and *C. neoformans* nucleic acid using the PCR method, respectively. *Streptococcus dysgalactiae* positive cases were all related to subclinical mastitis, and *C. albicans* and *C. neoformans* positive cases were all related to clinical mastitis. Given fungal mastitis's resistance to conventional therapies and its significant risks to the dairy sector, the results of this study will help determine the frequency of the infection and, consequently, the application of targeted management protocols.

***Keywords*:** Mastitis, Cattle, Bacteria, Fungus, Molecular detection

* Corresponding Author: kadivar.ali@sku.ac.ir