



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره سوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۱

صفحات ۲۳۴-۲۲۵

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و فراوانی برخی ژن‌های مولد بیوفیلم در استافیلوکوکوس اورئوس های جدایه از ورم پستان گاو

مسعود شماخی^{۱*}، فرهاد موسی خانی^۲، محمد ارجمندزادگان^۳، سمیرا دزفولی^۴

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات استان مرکزی-اراک، گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، کرج، ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، مرکز

تحقیقات سل و عفونی کودکان، اراک، ایران

۴- آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی مینا، کرج، ایران

*نویسنده مسئول: masoud_shamakhi@yahoo.com

چکیده

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) یکی از مهمترین باکتری‌ها در بین عوامل مسبب اورام پستان و آگیرداری می باشد که معمولاً طبیعت برگشت پذیر، مزمن و مقاوم به درمان دارد. یکی از متقاعدکننده ترین فرضیه های ارائه شده جهت عدم کارایی رژیم های درمانی آنتی بیوتیکی رایج در درمان اورام پستان استافیلوکوکوس اورئوس، توانایی آن ها در ساختن فاکتورهای حدت، همینطور توانایی تولید و رشد در ساختارهایی به نام بیوفیلم (biofilm) در درون بافت های آلوده است که منجر به ایجاد مقاومت به اغلب آنتی بیوتیک ها می گردد. این تحقیق بر روی ۲۰ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی استافیلوکوکوس اورئوس صورت پذیرفت. نتیجه ی تست آنتی بیوگرام این باکتری مقاومت ۱۰۰ درصدی به آنتی بیوتیک های پنی سیلین، کلوکساسیلین، کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین و در مقابل ۱۰۰ درصد حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های انزوفلوکسازین، جنتامایسین، نوویوسین، کوپاکتان، نافپزال، سفتی فور، فلوروفنیکل، لینکوسپکین، تترادلتا و جنتاماکس را نشان داد. میزان حساسیت در مورد آنتی بیوتیک های تایلوزین، لینکومایسین، سولتریم، تری متوپریم+سولفامتوکسازول، تراسایکلین، آمپی سیلین و آموکسی سیلین به ترتیب ۶۰، ۰، ۷۰، ۷۰، ۰، ۰ و ۴۵ درصد بدست آمد. در مورد فراوانی ژن های *bap* و *fib*، *fnbA*، *fnbB* که از ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلم می باشند، نتایج به ترتیب اعداد ۸۵، ۸۰، ۶۵ و ۰ درصد را نشان داد. نتایج حاکی از توانایی بالای این باکتری در تشکیل بیوفیلم و همچنین مقاومت بالا نسبت به آنتی بیوتیک های دسته ی بتالاکتام و آمینوگلیکوزیدها می باشد.

واژه های کلیدی: ورم پستان، استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلم، مقاومت آنتی بیوتیکی، گاو



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 3(4)225-234, 2013

Study on antibiotic resistance and frequency of some genes of biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis of cow

Shamakhi, M.^{1*}, Mousakhani, F.², Arjomandzadegan, M.³, Dezfouli, S.⁴

1- Department of Microbiology, Arak Science and Research branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

3- Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center and Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

4- MABNA veterinary diagnostic laboratory, Karaj, Iran

* *Corresponding author:* masoud_shamakhi@yahoo.com

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the most important bacterial cause of infectious mastitis is usually have reversible nature, chronic and resistant to treatment. One of the most convincing theories offered for the lack of effectiveness of antibiotic regimens in the treatment of *S. aureus* mastitis is both ability to build virulence factor and ability to generate and growth in structures called biofilms in infected tissues that can lead to resistance to most antibiotics. This research done on milk samples from 20 cows with clinical *S. aureus* mastitis. The result of antibiogram test are showed 100% resistance to antibiotics Penicillin, Cloxacillin, Kanamycin, Neomycin and Streptomycin against revealed 100% susceptibility to antibiotics Enrofloxacin, Gentamicin, Novobiocin, Cobactan, Nafpenzal, Ceftiofor, Florophenicol, Lincospectin, TETRA-DELTA and Gentamox. Antibiotic susceptibility to antibiotics Tylosin, Lincomycin, Soltrim, Trimethoprim+Sulfamethoxazol, Tetracycline, Ampicillin, and Amoxicillin, respectively was , 60, 0, 70, 70, 0, 0 and 45%. About prevalence of fib, fnbA, fnbB and bap genes that are involved in biofilm formation, results respectively to 85, 80, 65 and 0% showed. The results indicate high ability of *S.aureus* in biofilm formation and resistance to antibiotics categories Beta-lactam and Aminoglycosides.

Key words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, Biofilm, Antibiotic resistance, Cow

می‌کند باید مورد شناسایی قرار گیرد. یکی از متقاعدکننده‌ترین فرضیه‌های ارائه شده جهت عدم کارایی رژیم‌های درمانی آنتی‌بیوتیکی رایج در درمان اورام‌پستان / استافیلوکوکوس اورئوسی، توانایی آن‌ها جهت رشد در ساختارهایی به نام بیوفیلم (biofilm) در درون بافت‌های آلوده است که موجب محافظت پاتوژن‌ها از تاثیر عوامل ضد میکروبی و بدین ترتیب منجر به افزایش نوعی مقاومت ذاتی به اکثر این عوامل می‌گردد (۸،۲۳). با توجه به مفید نبودن تجویز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و گاه اثر معکوس آن‌ها در عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم، آگاهی نسبت به مقاومت‌های دارویی و میزان شیوع آن و همینطور تغییر الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی به مرور زمان همچنین روش‌های درمانی جدید می‌تواند سبب افزایش میزان بهبودی دام‌های مبتلا به ورم‌پستان‌های برگشت‌پذیر مرتبط با بیوفیلم گردد. هدف از انجام این طرح در مرحله اول بررسی الگوی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و تغییرات احتمالی این الگو و همینطور بررسی فراوانی برخی ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم و بررسی ارتباط احتمالی بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تولید بیوفیلم می‌باشد.

بیوفیلم ساختاری متشکل از سلول‌های باکتری است که در یک ماتریکس پلی‌مری که توسط خود باکتری تولید می‌گردد احاطه شده و به یک سطح زنده یا بی‌جان متصل می‌شوند (۵). باکتری‌ها در حالت بیوفیلم یک مقاومت ذاتی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها، ضد عفونی‌کننده‌ها و از بین رفتن توسط مکانیسم‌های دفاعی میزبان نشان می‌دهند.

تشکیل بیوفیلم شامل دو مرحله است: **مرحله اول**، که خود شامل دو فاز است. فاز اول چسبیدن به سطح است که این فاز مرحله‌ای مهم در وقوع کلونیزاسیون / استافیلوکوکوس اورئوس و چسبیدن باکتری‌های فاز شنای آزاد (پلانکتونیک) به سلول‌ها یا ماتریکس خارج سلولی آنها می‌باشد. این امر توسط آنتی‌ژن‌های کپسولی پلی‌ساکاریدی صورت می‌پذیرد (۱۵). برخی از مهمترین ژن‌های مربوط به فاکتورهای حدت چسبندگی که منجر به بالا رفتن احتمال چسبیدن سویه‌ها

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) یکی از مهمترین باکتری‌ها در بین عوامل مسبب اورام‌پستان و آگیردار می‌باشد که معمولاً طبیعت برگشت‌پذیر، مزمن و مقاوم به درمان دارد. اغلب بسیاری از جنبه‌های فارماکودینامیک و فارماکوکینتیک عوامل ضد میکروبی بکار رفته در درمان اورام‌پستان با توجه به مقاومت آشکار به درمان مورد بحث قرار گرفته است از میان سایر عوامل، انتقال آنتی‌بیوتیک به صورت سیستمیک از خون به شیر مهم به نظر می‌رسد که بستگی به میزان باند شدن به پروتئین‌های سرم، حلالیت در چربی، باند شدن به پروتئین‌های شیر و غیرفعال شدن توسط یون‌های شلاته‌کننده (کلسیم و منیزیم) در شیر دارد که بر روی کارایی کاربرد عوامل ضد میکروبی اثر می‌گذارند (۹). علاوه بر این انتشار بافتی عوامل ضد میکروبی ممکن است بوسیله تغییرات پاتولوژیک از قبیل نکروز و ایسکمی تحت تاثیر قرار گیرد و مانع از رسیدن این عوامل به محل عفونت گردد (۱۲).

همچنین پاتوژن‌ها ممکن است از دسترس آنتی‌بیوتیک‌هایی که انتشار محدودی در فضای خارج سلولی دارند (مانند آمینوگلیکوزیدها) فرار کنند. علاوه بر این / استافیلوکوکوس اورئوس‌های داخل سلولی که درون لکوسیت‌های چندهسته‌ای (Polymorphonuclear leukocytes) قرار دارند دوره تکثیر بسیار طولانی داشته و اغلب به عنوان باکتری‌های خوابیده یا در حال کمون (Dormant bacteria) نامیده می‌شوند و بنابراین حساسیت کمتری به آنتی‌بیوتیک‌هایی دارند که اثرات باکتریوسیدال خود را بر روی میکروارگانیسم‌های در حال تقسیم می‌گذارند. از جمله این آنتی‌بیوتیک‌ها پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها هستند (۷، ۲۴).

عدم کارایی رژیم‌های درمانی رایج به مقاومت‌های ذاتی و اکتسابی پاتوژن‌ها، انواع نقص‌های فارماکوکینتیک عوامل ضد میکروبی و فرمول آنها ارتباطی ندارد بلکه سایر عوامل احتمالی که پاتوژن‌ها را از تاثیر مواد ضد میکروبی محافظت

در تولید و بیان بیشتر آنزیم N-استیل گلوکزآمینیل ترانسفراز نقش مهمی بر عهده دارند. زمانی که بیوفیلیم به حجم مشخصی رسید تعادل دینامیک سبب می‌شود که لایه‌ی سلولی از دورترین نقطه شروع به ساخت ارگانسیم‌های پلانکتونیک کند. این باکتری‌ها از بیوفیلیم جداشده، آزاد می‌شوند و در سایر سطوح کلونیزه می‌گردند (۱۷).

مواد و روش کار

در این تحقیق، نمونه‌های شیر از گاوداری‌های مختلف استان تهران و از گاوهای با علائم ورم‌پستان بالینی طی ۶ ماه (پاییز و زمستان ۱۳۹۰) اخذ و به آزمایشگاه ارسال گردید. از نمونه‌های با شمارش سلول‌های سوماتیک بالاتر از ۲۰۰،۰۰۰ عدد در میلی‌لیتر (به روش میکروسکوپی) کشت صورت پذیرفت. سپس تعداد ۲۰ نمونه که باکتری *S.aureus* از آن شناسایی و جداسازی شده بود بصورت تصادفی از ۲۰ گاوداری متفاوت انتخاب شد و آنتی‌بیوگرام و به لحاظ وجود و یا عدم وجود چهار ژن *fnbA*، *fnbB*، *bap* که از ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلیم اند، PCR گردید.

جهت شناسایی و جداسازی *S.aureus* کشت بر روی محیط Blood Agar صورت پذیرفت. کلنی‌های گرم‌طلایی با همولیز دوناچی‌ای کامل و ناقص به محیط Baird Parker Agar انتقال یافت. کلنی‌های مشککی خاکستری براق مزرر با هاله‌ی دور آن جهت بررسی‌های تکمیلی انتخاب گردید. بررسی‌های تکمیلی شامل رنگ آمیزی گرم (کوکسی‌های گرم مثبت با آرایش خوشه‌ای)، کاتالاز (مثبت)، کوآگولاز (مثبت)، تست آنتی‌بیوگرام Novobiocin (حساس) و DNase (مثبت) می‌باشد (۱۰).

تست آنتی‌بیوگرام به روش Kirby Buerman شامل کشت از کلنی‌های تایید شده‌ی *S.aureus* در محیط مولر هیتون آگار و استفاده از ۲۲ دیسک آنتی‌بیوتیکی صورت پذیرفت (۲۲). جهت انجام واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) ابتدا استخراج

می‌گردد شامل *ebpS*، *bap*، *fnbB*، *fnbA*، *fib*، *clfB*، *clfA*، *coa*، *eno*، *cna* و... می‌باشد (۲). عوامل چسبندگی سطحی استافیلوکوکی مجموعاً "اجزاء سطح میکروبی شناساگر ملکول‌های زمینه چسبندگی" (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) یا به اختصار MSCRAMMs نامیده می‌شوند که باکتری را قادر به چسبیدن به فیبرینوژن، فیبرونکتین و کلاژن‌های میزبان می‌سازد (۲۳). فاز دوم شامل تکثیر سلول‌ها و تشکیل یک ساختار چند لایه‌ی سلولی است که به واسطه‌ی اتصال پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی به یکدیگر که موجب تشکیل بیوفیلیم البته به صورت ضعیف می‌شود، صورت می‌پذیرد (۲۵).

مرحله دوم، بلوغ بیوفیلیم و تشکیل بیوفیلیم‌های چند لایه می‌باشد. سرانجام در روند بلوغ بسیاری از استافیلوکوکوس‌ها یک گلیکوکالیکس (Glycocalyx) تولید می‌کنند که لایه‌ی لعابی (Slime layer) نامیده می‌شود و سبب محافظت باکتری‌های بیوفیلیم می‌شود. باکتری‌هایی که قادر به تولید لایه‌ی لعابی نیستند بیوفیلیم ضعیف‌تری تشکیل می‌دهند. طبیعت شیمیایی این لایه‌های چسبناک هنوز به طور کامل روشن نیست ولی شواهد نشان می‌دهد که عمدتاً از پلی‌ساکاریدهای هیدراته (hydrated polysaccharide) تشکیل شده است. در سال ۱۹۹۶ مک و همکاران (۱۵) گزارش کردند که توانسته اند دو قسمت پلی‌ساکاریدی مجزا از لایه‌های چسبناک جدا کنند. پلی‌ساکارید I (بیش از ۸۰٪) و پلی‌ساکارید II (کمتر از ۲۰٪). پلی‌ساکارید II به عنوان یک ساختار منحصر به فرد با عوامل چسبندگی داخل سلولی پلی‌ساکاریدی (Polysaccharide Intercellular Adhesin) یا به اختصار PIA در ارتباط بوده که فعالیتشان سبب تشکیل تجمع‌های سلولی می‌شود (۱۶). لوکوس *ica* که از ژن‌های *icaABCD* تشکیل شده (۱،۶)، و پروتئین‌های میانجی تولید PIA را در گونه‌های استافیلوکوکوس ایجاد می‌کند، نقش مهمی در تولید بیوفیلیم‌های چندلایه در *استافیلوکوکوس اورثوس بازی* می‌کند. دو ژن مهمتر این لوکوس شامل *icaA* و *icaD* می‌باشد که هر دو

مشخص (جدول ۳) قرار داده شد. همچنین بجز نمونه‌ها، یک نمونه‌ی کنترل مثبت و یک نمونه‌ی کنترل منفی نیز مورد استفاده قرار گرفت. جهت شناسایی ژن‌های مورد نظر، آشکارسازی و آنالیز محصول PCR توسط الکتروفورز در ژل آگارز و بررسی سایز باند ژن‌های مورد نظر (جدول ۱) صورت پذیرفت.

DNA از کلنی‌های تایید شده‌ی *S.aureus* با استفاده از کیت Molecular Biological System Transfer و طبق دستور سازنده‌ی کیت صورت پذیرفت. جهت برقراری واکنش زنجیره‌ی پلی‌مرز مقدار ۵ μl از DNA استخراج شده بعلاوه‌ی ۲۰ μl مسترمیکس ساخته شده‌ی مجزا برای هر ژن (جدول ۲) طبق دستور کیت مربوطه (QIAGEN) مخلوط شده و در داخل دستگاه ترموسیکلر با برنامه زمانی

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در طرح

Gene	Target gene	Primer sequence 5' to 3'	TM°	Annealing °C	Product size (bp)	references
<i>fib</i>	fibrinogen binding protein	F-CTACAACACTACAATTGCCGTC AACAG	65.4	60	404	14,26
		R-GCTCTTGTAAGACCATTTCTTCAC	63.0			
<i>fnbA</i>	fibronectin binding protein A	F-	63.1	60	643	14,26
		R-GCTCTTGTAAGACCATTTCTTCAC	63.9			
<i>fnbB</i>	fibronectin binding protein B	F-	63.2	57	524	14,26
		R-CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	58.9			
<i>bap</i>	biofilm associated protein	F-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATT	59.0	57	971	8,14,26
		R-	62.8			

جدول ۲- اجزای سازنده‌ی مسترمیکس برای هر ژن بصورت مجزا

مقدار (ب حسب μl)	اجزاء
۲/۵	یاق PCR
۰/۵	dNTP
۰/۵	پرایمر F (غلظت ۱۰ pM)
۰/۵	پرایمر R (غلظت ۱۰ pM)
۰/۵	MgCl ₂
۵	Q solution
۰/۲	Taq DNA Polymerase
۱۰/۳	آب مقطر استریل
۲۰	جمع

جدول ۳- شرح برنامه‌ی مورد استفاده در دستگاه ترموسیکلر

Stage	Temperature (°C)	Time
Primery denaturation	94	3 min
×35	Denaturation	30 sec
	Annealing	جدول ۱
	Extension/Elongation	1 min
Final extension/elongation	72	10 min

نتایج

ژن‌های مولد بیوفیلیم مورد بررسی در جدول شماره ۵ آورده

نتیجه‌ی تست آنتی‌بیوگرام در جدول شماره ۴ و فراوانی شده است.

جدول ۴- نتیجه‌ی تست آنتی‌بیوگرام

آنتی‌بیوگرام			آنتی‌بیوتیک	آنتی‌بیوگرام			آنتی‌بیوتیک
حساس	ایترمدیت	مقاوم		حساس	ایترمدیت	مقاوم	
۷۰٪	۲۵٪	۵٪	Soltrim(SLT)	۰٪	۰٪	۱۰۰٪	Penicillin
۷۰٪	۲۵٪	۵٪	Trimethoprim+Sulfamethoxazol	۰٪	۰٪	۱۰۰٪	Cloxacillin
۰٪	۸۵٪	۱۵٪	Tetracycline	۶۰٪	۴۰٪	۰٪	Tylosin
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Lincospectin	۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Enrofloxasin
۰٪	۰٪	۱۰۰٪	Kanamycin	۰٪	۶۰٪	۴۰٪	Lincomycin
۰٪	۰٪	۱۰۰٪	Neomycin	۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Gentamycin
۰٪	۰٪	۱۰۰٪	Streptomycin	۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Novobiocin
۰٪	۶۰٪	۴۰٪	Ampicillin	۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Cobactan
۴۵٪	۵۵٪	۰٪	Amoxicillin	۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Nafpenzal
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	TETRA-DELTA	۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Ceftiofor
۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Gentamox	۱۰۰٪	۰٪	۰٪	Florophenicol

جدول ۵- فراوانی ژن‌های مولد بیوفیلیم مورد بررسی

<i>bap</i>	<i>fnbB</i>	<i>fnbA</i>	<i>fib</i>	ژن‌های مورد
۰٪	۶۵٪	۸۰٪	۸۵٪	فراوانی

بحث و نتیجه‌گیری

زیرا باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* هنوز هم نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها حساس می‌باشد که البته در صورت مصرف بی‌رویه و گاه نادرسر خطر مقاومت شدن به این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز وجود دارد. به‌طور کلی مقاومت بالایی در دسته‌ی آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و آمینوگلیکوزیدها مشاهده شد. مطالعه‌ی در سال ۱۳۸۲ در شیراز (۱۹) مقاومت صددرصدی نسبت به پنی‌سیلین، و حساسیت صددرصدی نسبت به جنتامایسین و انروفلوکساسین را نشان داد که این یافته‌ها کاملاً با یافته‌های این تحقیق مطابق است. طی یک مطالعه در سال ۱۳۸۲ توسط بلورچی و همکاران (۴) بر روی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را نسبت به پنی‌سیلین‌جی، تایلوزین و انروفلوکساسین کاملاً حساس، حساسیت متوسط نسبت جنتامایسین، و مقاوم به استرپتومایسین و آمپی‌سیلین نشان داد. مقایسه نتایج فوق با یافته‌های تحقیق حاضر در مورد حساسیت این باکتری به

مطالعه‌ی حاضر میزان مقاومت ۱۰۰ درصدی برای آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، کلوکساسیلین، کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین و میزان حساسیت ۱۰۰ درصدی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های انروفلوکساسین، جنتامایسین، نوویوسین، کوباکتان، نافپنزال، سفتری‌فور، فلوروفنیکول، لینکوسپکین، ترا-دلتا و جنتاماکس را نشان می‌دهد. میزان مقاومت برای آنتی‌بیوتیک‌های تایلوزین، لینکومایسین، سولتریم، تری‌متوپریم+سولفامتازول، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین به ترتیب ۰، ۷۰، ۷۰، ۰، ۴۵ و ۰ درصد بدست آمد. ۱۰۰ درصد نمونه‌ها، به ۱۵ آنتی‌بیوتیک از ۲۲ آنتی‌بیوتیک، یا مقاوم بودند یا حساس، که بیانگر رسیدن میزان مقاومت برای برخی آنتی‌بیوتیک‌ها به مرز ۱۰۰٪ که نوعی هشدار محسوب می‌شود و از طرف دیگر همچنان نوعی فرصت وجود دارد

انروفلوکساسین و مقاومت به استرپتومایسین کاملاً منطبق است. نکته قابل تامل اینکه در مطالعه فوق حساسیت کامل به پنی‌سیلین گزارش شده است در حالی که تحقیق حاضر مقاومت کامل به پنی‌سیلین را نشان می‌دهد. مطالعه‌ی انجام شده در سال ۲۰۰۴ در پاکستان (۱۳) با مطالعه حاضر در مورد لینکومایسین، تراسایکلین تقریباً مشابه و در مورد پنی‌سیلین اختلاف فاحش دارد. مطالعه‌ی در سال ۲۰۰۴ در ترکیه (۲۲) میزان مقاومت بالا نسبت به بتالاکتام‌ها را نشان داد که مطالعه‌ی حاضر نیز همین مطلب را تایید می‌کند. طی مطالعه‌ی بین سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۷ در کره جنوبی (۱۸)، تنها ۲/۴٪ از سویه‌ها، به متی‌سیلین مقاومت نشان دادند که بیانگر عدم مقاومت به دسته‌ی بتالاکتام‌ها در این کشور است. مطالعه‌ی حاضر و مقایسه آن با سوابق پژوهشی در این زمینه نشان می‌دهد که الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف متفاوت می‌باشد و الزاماً با مناطق دیگر ارتباطی ندارد لذا پیشنهاد می‌شود الگوی مقاومت بصورت سالانه در هر منطقه تعیین گردد تا دامپزشکانی که به امر درمان می‌پردازند راهنمایی‌های کاربردی در اختیار داشته باشند، همینطور با توجه به متفاوت بودن الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مناطق مختلف لزوم انجام تست آنتی‌بیوگرام در درمان اورام پستان/استافیلوکوکوس/اورئوس ضروری به نظر می‌رسد.

در مورد فراوانی ژن‌های *fib*، *fnbA*، *fnbB* و *bap* که از ژن‌های دخیل در تشکیل بیوفیلم می‌باشند، نتایج به ترتیب اعداد ۸۵٪، ۸۰٪، ۶۵٪ و ۰٪ را نشان می‌دهد که حاکی از توانایی بالای این باکتری در تشکیل بیوفیلم می‌باشد.

در خصوص فراوانی ژن *fib* مطالعه‌ی حاضر فراوانی ۸۵٪ را نشان می‌دهد، مطالعه خرمیان (۱۴) بر روی نمونه‌های جدا شده از ورم‌پستان گاو در سال ۱۳۹۰ فراوانی ۸۱/۱٪، مطالعه‌ی یئون-سو (۲۶) در سال ۲۰۰۸ فراوانی ۱۴٪ در سویه‌های دامی، مطالعه‌ی ون‌کراینست (۲۳) در سال ۲۰۰۴ فراوانی ۹۸/۳٪ و مطالعه‌ی در سال ۱۹۹۵ در امریکا (۳) فراوانی

۱۰۰٪ در زخم انسان و ۰٪ در ورم‌پستان را نشان می‌دهد. در خصوص فراوانی ژن *fnbA* و *fnbB* مطالعه‌ی حاضر به ترتیب فراوانی ۸۰٪ و ۶۵٪ را نشان داد، مطالعه‌ی خرمیان به ترتیب ۵۰٪ و ۶۱/۱٪، مطالعه‌ی یئون-سو به ترتیب ۰٪ و ۰٪، مطالعه‌ی ون‌کراینست در سویه‌های با حدت پایین به ترتیب ۹۱٪ و ۸۳٪ و در سویه‌های با حدت بالا به ترتیب ۹۶٪ و ۳۷٪، مطالعه‌ی در هلند (۱۱) در سال ۲۰۰۷ به ترتیب ۹۶٪ و ۴۳٪، مطالعه‌ی در جاوای اندونزی و همزمان در هس آلمان (۲۱) در سال ۲۰۰۴ به ترتیب ۱۰۰٪ و ۰٪ را در جاوا و به ترتیب ۱۰۰٪ و ۵٪ را در هس به ثبت رساند.

در خصوص فراوانی ژن *bap* مطالعه‌ی حاضر فراوانی ۰٪ را نشان داد، مطالعه‌ی خرمیان و یئون-سو هم ۰٪ را نشان دادند در حالی که مطالعه‌ی کوکارللا (۸) در سال ۲۰۰۴ فراوانی ۲۵/۶٪ را برای ژن *bap* را نشان داد.

اعداد بالا نشان می‌دهد که الگوی فراوانی ژن‌های مولد بیوفیلم از ناحیه‌ای به ناحیه دیگر ممکن است کاملاً متفاوت باشد. البته همین مطالعات نشان می‌دهد باکتری *S. aureus* عموماً حداقل در مورد یک یا چند ژن مولد بیوفیلم مثبت است. به عنوان مثال در مطالعه‌ی حاضر نمونه‌ای یافت نشد که به لحاظ وجود چهار ژن مورد بررسی منفی باشد که این مطلب توانایی بالای این باکتری را در تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد.

در مورد میزان اهمیت ژن‌های فاکتورهای حدت چسبندگی نظرات متفاوت است. مثلاً خرمیان *ebps* و یئون-سو ژن *eno* را مهمترین ژن معرفی می‌کنند. نعمتی (۲۰) نظر یئون-سو را در این زمینه رد می‌کند. نکته مهم اینکه در مورد ژن‌های مرحله‌ی دوم تشکیل بیوفیلم تقریباً اتفاق نظر وجود دارد و اکثر مقالات لوکوس ژنی *icaR* که متشکل از ۴ ژن *icaABCD* و در این میان *icaA* و *icaD* از همه مهمتر است را تایید می‌کنند. با این استدلال که با حذف این لوکوس ژنی روند تولید PIA مختل شده و بیوفیلم شکل نمی‌گیرد. البته

References

- 1- Arciola, R., Baldassarri, L., Montanaro, L. (2001) Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (6) 2151-56
- 2- Barkema, H.W., Schukken, Y.H., Zadoks, R.N. (2006) The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science* 89 (6) 1877-1895
- 3- Boden, M.K., Flock, J.I. (1995) Incidence of the highly conserved *fib* gene and expression of the Fibrinogen-Binding (Fib) protein among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (9) 2347-2352
- 4- Bolourchi, M., Kasravi, R., Tabatabayi, A.H., Hovareshti, P. (2004) The effect of a mastitis control program on some udder health and milk quality indices in a large dairy herd in Tehran province. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran* 59 (2) 115-124
- 5- Costerton, J.W., Stewart, S., Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418) 1318-22
- 6- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Gotz, F. (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and required for biofilm formation. *Infection and Immunity* 67 (10) 5427-33
- 7- Craven, N., Anderson, J.C. (1984) Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *invitro* and *invivo*. *Journal of Dairy Re-*

طبق تحقیق کوکارللا در صورت حذف لوکوس *icaR* به شرط وجود ژن *bap* بازهم بیوفیلم تشکیل می‌شود.

- search 51 (4) 513-23
- 8- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R. (2004) Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity** 72 (4) 2177-2185
- 9- Du Preez, J.H. (2000) Bovine mastitis therapy and why it fails. Journal of the South African Veterinary Association 71 (3) 201-208
- 10- Harrison, L.S. Staphylococci. In: Mahon C.R, Lehman D.C and Manuselis G. (2007) Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd ed., Saunders Elsevier, China, 367-381
- 11- Ikawaty, R., Brouwer, C., Van Duijkeren, E., Mevius, D., Verhoef, J., Fluit, A.C. (2010) Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. International Journal of Dairy Science 5 (2) 60-70
- 12- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (1993) Pathology of Domestic Animal. 4th ed., Academic Press Limited., California, 454-469
- 13- Kalsoom, F., Hussain Shah, S.N., Jabeen, F. (2004) Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. Journal of Research (Science) 15 (2) 145-151
- 14- Khoramiyan, B. (2011). Combined effect of antibiotics and enzymes in the treatment of staphylococcal mastitis, with the ability to form biofilms in vitro. PhD thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran (text in persian)
- 15- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., Laufs, R. (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. Journal of Bacteriology 178 (1) 175-83
- 16- McKenney, D., Pouliot, K.L., Wang, Y., Murthy, V., Ulrich, M., Doring, G., Lee, J.C., Goldmann, D.A., Pier, G.B. (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an *in vivo* expressed antigen. Science 284 (5419) 1523-7
- 17- Michael, W., Dunne, Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. Clinical Microbiology Reviews 15 (2) 155-166
- 18- Moon, J.S., Lee, A.R., Kang, H.M., Lee, E.S., Kim, M.N., Paik, Y.H., Park, Y.H., Joo, Y.S., Koo, H.C. (2007) Phenotypic and genetic antibiogram of Methicillin-resistant Staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. Journal of Dairy Science 90 (3) 1176-1185
- 19- Nazer, A.H.K., Sarmadi, R. (2005) Prevalence of clinical and subclinical mastitis, antibiotic resistance and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) in *staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis. Journal of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran 60 (3) 247-252
- 20- Nemati, M., Hermans, K., Devriese, L.A., Maes, D., Haesebrouck, F. (2009) Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formatting in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. Avian Pathology 38 (6) 513-517
21. Oktavia Salasia, S.I., Khusnan, Z., Lammler, C., Zschock, M. (2004) Comparative studies on phenotypic and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central

Java in Indonesia and Hesse in Germany. Journal of Veterinary Science 5 (2) 103–109

22- Turutoglu, H., Ercelik, S., Ozturk, D. (2006) Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. Bulletin of the Veterinary Research Institute in Pulawy 50 (1) 41-45

23- Vancraeynest, D., Hermans, K., Haesebrouck, F. (2004) Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. Veterinary Microbiology 103 (3-4) 241-247

24- Yancey, R.J., Sanchez, M.S., Ford, C.W. (1991) Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 10 (2) 107-113

25- Yarwood, J.M., Schlievert, P.M. (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. Journal of Clinical Investigation 112 (11) 1620-1625

26- Yeon Soo, S., Deog Yong, L., Rayamahji, N., Mi Lan, K., Han Sang, Y. (2008) Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus spp* isolated from animals and air. Research in Veterinary Science 85 (3) 433-438