

نقش ژن بیوفیلیم در مقاومت آنتی بیوتیکی و پاتوژنز ورم پستان استافیلوکوکوس اورئوس

سیده فروتن^۱، محمد امین اسلامپور*^۲، محمد ایمان عینی^۳، فرشته جبل عامل^۴، قاسم اکبری^۲

۱- دستیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استاد گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دانشیار گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۰

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین پاتوژن واگیردار در ورم پستان گاو است. این پاتوژن توانایی تشکیل بیوفیلیم و متعاقباً ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی را دارد. هدف از این مطالعه توصیف رابطه بین ژن‌های کد کننده بیوفیلیم، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و روند بیماری زایی در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس ورم پستان تحت بالینی گاو است. گاوهای شیری از نظر ابتلا به ورم پستان تحت بالینی غربالگری شدند. ایزوله‌ها با روش فوتیپی و حضور ژن *nuc* شناسایی شدند. امکان و کمیت تشکیل بیوفیلیم مشخص شد. ژن‌های وابسته به بیوفیلیم شناسایی شد. حساسیت ضد میکروبی ایزوله‌ها در حالت پلانکتونی با استفاده از روش DAD انجام شد. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد توسط MIC₅₀ تعیین گردید. حداقل غلظت از بین برنده بیوفیلیم با روش رنگ سنجی تعیین شد. تعداد سلول‌های سوماتیک شیر به عنوان شاخص شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی ایزوله‌ها توانایی تولید بیوفیلیم را داشتند و اکثر آنها بیوفیلیم قوی تشکیل دادند. ژن‌های *icaD* و *fnbB*، به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند. نتایج تست آنتی بیوگرام به ترتیب، بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی را در برابر پنی سیلین و سفتریوفور نشان داد. سلول‌های بیوفیلیم در برابر فعالیت باکتری‌سیدالی سفتریوفور، مقاومت نشان دادند. میانگین سلول‌های سوماتیک در نمونه‌هایی که ژن‌های *icaA* و *icaD* داشتند بیشتر بود ($P < 0.05$). توانایی تشکیل بیوفیلیم، فاکتور حدت مهمی در ایجاد مقاومت آنتی بیوتیک و افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر است. نتایج به دست آمده بیانگر ناکارآمدی سفتریوفور در درمان عفونت‌های ناشی از ورم پستان تحت بالینی در شرایط تشکیل بیوفیلیم می باشد.

کلمات کلیدی: بیوفیلیم، ورم پستان گاوی، ورم پستان تحت بالینی، استافیلوکوکوس اورئوس، سلول‌های سوماتیک

* نویسنده مسئول: محمد امین اسلامپور

آدرس: گروه علوم درمانگاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱-۴۴۸۶۵۱۷۹

پست الکترونیک: maeslampour@gmail.com

ورم پستان بیماری شایع و پرهزینه‌ای است. ورم پستان علاوه بر اینکه کیفیت شیر را به مخاطره می‌اندازد، به ظهور و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز کمک می‌کند (۱). ورم پستان تحت بالینی زمانی رخ می‌دهد که با افزایش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر، شواهدی از وجود التهاب وجود دارد، ولی هیچ تغییری در شیر یا پستان قابل مشاهده نمی‌باشد (۲، ۳). بین سلول‌های سوماتیک و تولید شیر رابطه مهمی وجود دارد، چرا که با کاهش تولید به دلیل وقوع ورم پستان تعداد سلول افزایش می‌یابد (۴). هنگامی که از ورم پستان گاوی صحبت می‌کنیم، استافیلوکوکوس‌ها به دلیل پراکندگی گسترده و فراوانی وقوع، اهمیت بالایی پیدا می‌کنند. استافیلوکوکوس اورئوس یک میکروارگانیسم مهم در عفونت‌های ورم پستان گاوی است. شناخت عوامل دخیل در پاتوژن ورم پستان استافیلوکوکوس اورئوس و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن، امکان جهت‌گیری بهتر اقدامات کنترل و درمان را فراهم می‌کند. روند بیماری‌زایی استافیلوکوکی، با چسبندگی میکروارگانیسم به بافت میزبان آغاز می‌شود. توانایی چسبندگی به عنوان یک عامل حدت شناخته می‌شود و از آن به عنوان مولکول‌های چسبندگی ماتریسی (Adhesive Matrix Molecules) یاد می‌شود. درگیری این مولفه‌ها در بیماری‌زایی هنوز به طور کامل شناخته نشده است. برخی از این پروتئین‌ها، پروتئین اتصال دهنده فیبرونکتین A و B هستند که با ژن‌های *fnbA* و *fnbB* کد می‌شوند (۵، ۷). بیوفیلیم‌ها از جمله عوامل حدت سلول‌زایی هستند که توسط سلول‌های باکتریایی تجمع یافته و توسط پلی ساکاریدهای تولید شده توسط خود باکتری‌ها ایجاد می‌شوند. استافیلوکوکوس اورئوس مسبب ورم پستان گاو، توانایی تولید بیوفیلیم را دارد. از آنجا که تشکیل بیوفیلیم

منجر به مقاومت در برابر تداخل مکانیکی، مکانیسم‌های دفاع میزبان و عوامل ضد میکروبی می‌شود (۷، ۹)، عفونت‌های بیوفیلیمی اغلب مزمن و راجعه هستند (۶). میکروارگانیسم‌های محصور در بیوفیلیم دارای وضعیت ثابت متابولیکی یا به اصطلاح در حالت سسیل (Bacterial Sessile) قرار می‌گیرند (۶). حصر در ماتریس خارج سلولی و متابولیک غیر فعال میکروارگانیسم‌ها، اثر بخشی آنتی‌بیوتیک‌ها را محدود می‌کند (۸). اپرون *ica*، سنتز چسبندگی بین سلولی پلیمری (Polymeric Intercellular Adhesion)، ماده اصلی تشکیل دهنده بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس را بر عهده دارد (۱۰، ۱۱)، و بوسیله ژن‌های *icaADBC* کد می‌شود (۵). پروتئین مرتبط با بیوفیلیم (Biofilm-Associated Protein) پروتئینی است که نقش مهمی در مراحل اولیه توسعه بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس دارد. اهمیت *bap* در بیوفیلیم استافیلوکوکوس اورئوس به قدری قابل توجه است که اگر استافیلوکوکوس اورئوسی *bap* مثبت باشد ولی اپرون *ica* آن مختل شده باشد، باز هم می‌تواند تشکیل بیوفیلیم دهد (۱۲). پیش از این مطالعه‌ای در خصوص تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در حالت پلانکتونی و بیوفیلیمی در ورم پستان تحت بالینی استافیلوکوکوس اورئوسی گاو که شناساگر روند تعداد سلول‌های سوماتیک شیر و ژن‌های کدکننده بیوفیلیم باشد، انجام نشده است. بدین ترتیب با توجه به ضرورت انجام این تحقیق، داده‌های به دست آمده از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های حدت با تعداد سلول‌های سوماتیک می‌تواند اطلاعات بیشتری در این رابطه را گردآوری نماید و بنابراین امکان تدوین استراتژی‌های کارآمدتر برای درمان و کنترل این بیماری را سبب شود.

مواد و روش کار

ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس

نمونه گیری از ۵ گاوداری صنعتی در استان تهران انجام شد. گاوهای شکم ۱-۹ دارای تعداد سلولهای سوماتیک آستانه‌ی دویست هزار تا پانصد هزار، بسته به شیوع استاف اورئوس در سطح گله، در شمارش ماهیانه به روش فوزوماتیک، جهت نمونه گیری کاندید شدند. با انجام CMT کارتیه مبتلا شناسایی شده و جهت کشت و شمارش سلول‌های سوماتیک نمونه گیری انجام شد. نمونه شیر در آزمایشگاه در محیط بلاد آگار کشت داده شد. در صورت رشد هرگونه پرگنه، به منظور تعیین هویت قطعی و تأیید تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس، نمونه‌ها تحت آزمایشات کاتالاز، دی‌ان‌از (DNase) و کوآگولاز قرار گرفتند. ایزوله‌هایی که به تست کوآگولاز لوله ای پاسخ مثبت داده بودند از لحاظ حضور ژن *nuc* به روش PCR ردیابی شدند. چراکه ژن *nuc* در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس حالت اختصاصی دارد. استخراج DNA و توالی پرایمر به ترتیب با استفاده از پروتکل Fatholahzadeh (۱۳) و Sahebkhari (۱۴) انجام پذیرفت. از ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* به عنوان سویه کنترل استفاده شد. پس از شناسایی قطعی ۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس، روند نمونه گیری متوقف شد. سپس، از هر ایزوله یک اینوکولوم در TSB (MERCK, Germany) حاوی ۱٪ گلوکوز تهیه شد [۱۵] (شکل ۱-الف).

توانایی تولید بیوفیلیم

تشکیل آزمایشگاهی بیوفیلیم پیش از این توسط Stepanović (۱۶) تشریح شده است. هر اینوکولوم از استافیلوکوکوس اورئوس به نسبت ۲:۲۰۰ در محیط

TSB به همراه ۱٪ گلوکوز رقیق شد و در پلیت‌های استریل (Tissue culture plate 96 wells, JET) (BIOFIL, Canada) ریخته شد. انکوباسیون هوازی به مدت ۲۴ ساعت (۳۷ درجه سانتیگراد) انجام شد. پس از آن ماده شناور رویی (Supernatant) دور ریخته شده و چاهک‌ها سه مرتبه شسته شدند. رسوبات توسط بوئین (۶۰ درجه سانتیگراد، ۱ ساعت) فیکس و با کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. سپس رنگ متصل به سلولها با اتانول ۹۵٪ حل شد. از ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* و برات (TBS + ۱٪ گلوکوز) به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. چگالی نوری در ۵۷۰ نانومتر تنظیم شد و توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek) خوانده شد. نقطه جداکننده (Cut off) و طبقه بندی شدت تشکیل بیوفیلیم به ترتیب با فرمول ۱ و ۲ تعریف شد. تمامی مراحل سه مرتبه انجام شد (شکل ۱-ب).

ODc = average OD of negative control + (3SD of negative control)

فرمول ۱- تعرف کات آف

OD ≤ ODc = no; ODc < OD ≤ 2ODc = weak;
2ODc < OD ≤ 4ODc = moderate; 4ODc < OD = strong

فرمول ۲- شدت تشکیل بیوفیلیم

ردیابی ژن های کد کننده بیوفیلیم

ژنهای *icaAD*, *bap* و *fibAB* با استفاده از روش PCR ردیابی می‌شوند. توالی پرایمر با استفاده از پروتکل Vancaeynest [۱۷] انجام پذیرفت (جدول ۱). از ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* و ATCC 12228 *Staphylococcus epidermidis* به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد (شکل ۱-ب).

Gene	primer sequence (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	Amplicon size (bp)
<i>icaA</i>	5'-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3'	۴۹	۱۳۱۵
	5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3'		
<i>icaD</i>	5'-AAACGTAAGAGAGGTGG-3'	۴۹	۳۸۱
	5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3'		
<i>fnbA</i>	5'-CATAAATTGGGAGCAGCATCA-3'	۶۲	۹۷۱
	5'-ATCAGCAGCTGAATCCCAT-3'		
<i>fnbB</i>	5'-GTAACAGCTAATGGTTCGAATTGATACT-3'	۵۰	۱۲۷
	5'-CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC-3'		
<i>bap</i>	5'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAATTG-3'	۵۵	۵۲۴
	5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3'		

حداقل غلظت ممانعت کننده (MIC) آنتی

بیوتیک سفتیوفور

پس از تعیین مقاومت آنتی-بیوتیکی در حالت پلانکتونی، مشخص شد که ۱۰٪ ایزوله‌ها در شرایط پلانکتونی نسبت به سفتیوفور حساس هستند. سفتیوفور آنتی-بیوتیک رایجی در درمان ورم پستان گاوی می‌باشد. با این حال در برخی موارد روند سلول‌های سوماتیک، پاسخ به درمان خوبی را نشان نمی‌دهند. از اینرو، این آنتی-بیوتیک به عنوان آنتی-بیوتیک منتخب برای ادامه پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت ممانعت کننده آنتی بیوتیک سفتیوفور در برابر سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی، با استفاده از روش برات میکرودایلوشن (Broth Microdilution) انجام شد (۱۸). به طور خلاصه، برات Mueller-Hinton حاوی آنتی بیوتیک سفتیوفور در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. ۰/۵ مک فارلند از ایزوله‌ها برداشته و تا $10^5 \times 5$ رقیق شدند، و در هر چاهک تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت (۳۷ درجه سانتیگراد) انکوبه شدند. MIC بعنوان کمترین میزان عامل ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شود که از رشد دیده شدنی باکتری جلوگیری نماید. آستانه حساسیت و نقطه شکست در مقاومت آنتی بیوتیکی به سفتیوفور بر اساس دستورالعمل CLSI به ترتیب $2 \leq$ و $8 \leq \mu\text{g/mL}$

تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیک به روش

دیسک آگار دیفیوژن

آزمون دیسک دیفیوژن به منظور تعیین حساسیت استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده به آنتی بیوتیک‌های ارائه شده در ادامه و باتوجه به دستورالعمل CLSI انجام شد (۱۸). به طور خلاصه سوپانسیون باکتریایی (۰/۵ مک فارلند در سرم فیزیولوژی) در سطح محیط (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) Mueller Hinton تلقیح و بعد از چند دقیقه دیسکهای آنتی بیوتیکی (Mastdiscs®, UK) شامل پنی سلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفتیوفور (۳۰ میکروگرم)، آمپی سیلین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، تری متوپریم/سولفامتازول (۲۳,۷۵/۱,۲۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم) در سطح محیط قرار داده شده و سپس در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. هاله‌های عدم رشد برای کلیه آنتی بیوتیکها با خط کش و برحسب میلی متر اندازه گیری شد (شکل ۱-ج).

روند بیماری زایی ایزوله‌ها در کارته‌های

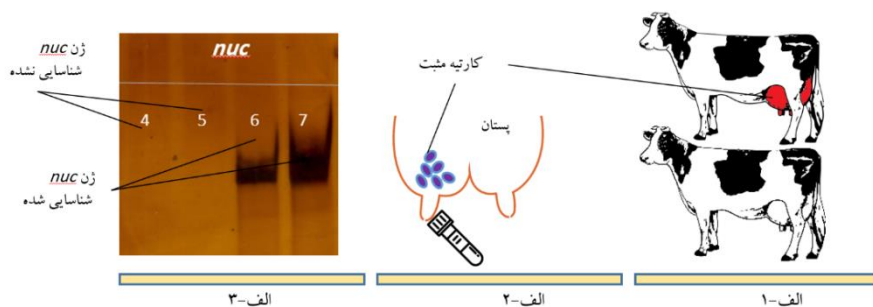
مبتلا

در این مرحله از مطالعه روند بیماری زایی در کارته‌های مبتلا بر اساس سیر نزولی و صعودی تعداد سلول‌های سوماتیک بررسی شد. بدین صورت که اطلاعات مربوط به شمارش سلولهای سوماتیک به صورت ماهیانه ثبت شده و روند کاهش و افزایش آنها طی سه ماهه بعد و قبل از بیماری مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط بین روند افزایش سلول‌های سوماتیک شیر به عنوان شاخصی برای شدت بیماری در سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس دارای توانایی تولید بیوفیلیم مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های شیر در لوله‌های حاوی برونوپول (bronopol) جمع آوری شدند و با تعداد سلول‌های سوماتیک هر نمونه با دستگاه فوسوماتیک شمارش شد (شکل ۱-۵).

تعریف شده است. *Staphylococcus ATCC 29213 aureus* به عنوان سویه کنترل استفاده شد (شکل ۱-۵).

حداقل غلظت از بین برنده‌ی بیوفیلیم (MBEC) آنتی بیوتیک سفتیوفور

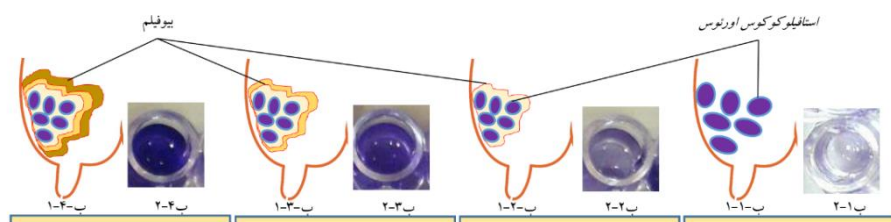
تمام ایزوله‌ها در حالت پلانکتونیک به سفتیوفور حساس بودند، بنابراین جهت سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌ها در حالت شرایط بیوفیلیم از روش رنگ سنجی شرح داده شده توسط Amorena (۱۹) استفاده شد. شرح تشکیل بیوفیلیم پیش از این ارائه شده است. پس از تشکیل بیوفیلیم در پلیت ۹۶ خانه، به هر چاهک ۱۰۰ μL سفتیوفور افزوده شده و به مدت ۲۰ ساعت (۳۷ درجه سانتیگراد) انکوبه شدند. سپس ۵۰ μL از ریجنت XTT (Roche, Germany) به هر چاهک افزوده شده و به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند (۲۰). میزان MBEC به عنوان حداقل غلظت از بین برنده‌ی بیوفیلیم در نظر گرفته شد (۲۱). تمامی مراحل سه مرتبه انجام شد (شکل ۱-۵).



الف-۱- گاوهای شیری از نظر ورم پستان تحت بالینی غربالگری شدند.
الف-۲- شیر کارته‌های مثبت به آزمایشگاه منتقل و آزمایشات میکروبیولوژیک کلاسیک انجام شد.
الف-۳- ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از تشخیص ژن *nuc* با روش PCR تایید شدند.

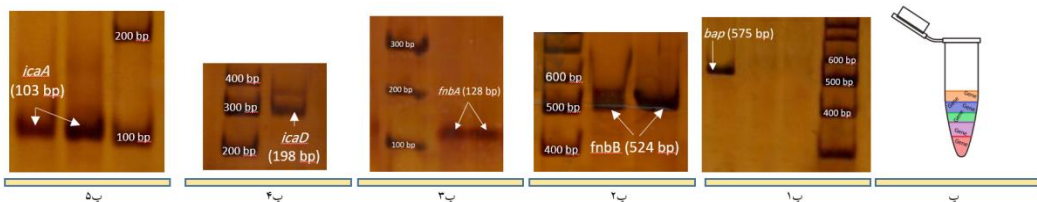
الف ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس

ب مطالعه تشکیل بیوفیلیم



ب-۱- تصویری از تشکیل بیوفیلیم در پستان
ب-۲- بیوفیلیم در آزمایشگاه تشکیل نشده است (کنترل منفی)
ب-۱-۲- تصویری از تشکیل ضعیف بیوفیلیم در پستان
ب-۲-۲- تشکیل ضعیف بیوفیلیم در آزمایشگاه (درجه ۱)

- ب۳-۱- تصویری از تشکیل متوسط بیوفیلم در پستان (درجه ۲)
 ب۳-۲- تشکیل متوسط بیوفیلم در آزمایشگاه (درجه ۲)
 ب۴-۱- تصویری از تشکیل قوی بیوفیلم در پستان (درجه ۳)
 ب۴-۲- تشکیل قوی بیوفیلم در آزمایشگاه (درجه ۳)



پ-۱ ژن *bap* پ-۲ ژن *fnbB* پ-۳ ژن *fnbA* پ-۴ ژن *icaD* پ-۵ ژن *icaA*

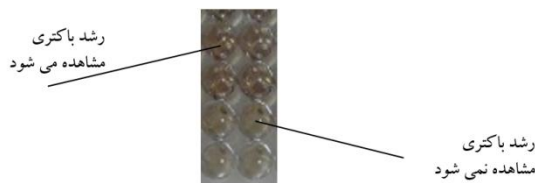
پ شناسایی ژن های بیوفیلم

ج حساسیت آنتی بیوتیکی/انتشار دیسک (DAD)



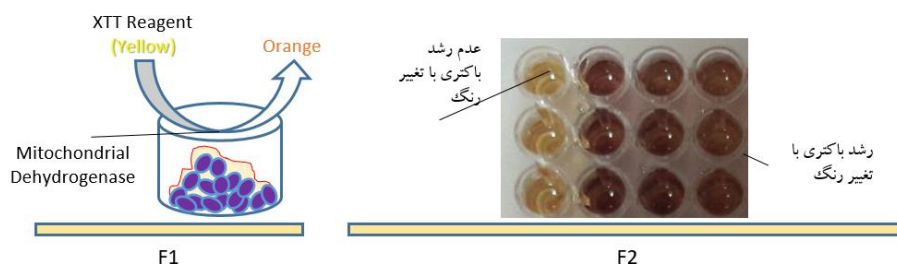
ج- تست حساسیت آنتی بیوتیکی (پنی سیلین، جنتامایسین، سفیوفور، آمپی سیلین، اریترومایسین، تریمتوپریم/سولفامتوکسازول، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، سپروفلوکساسین، اتروفلوکساسین) با استفاده از روش DAD انجام شد.

د حساسیت آنتی بیوتیکی (MIC)



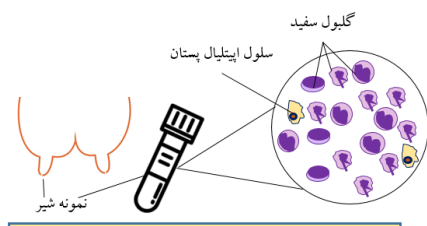
د- حساسیت ضد میکروبی ایزوله ها با استفاده از تعیین روش MIC انجام شد. MIC به عنوان کمترین عامل ضد میکروبی جلوگیری از رشد قابل مشاهده در نظر گرفته شد.

ه حداقل غلظت محدود کننده بیوفیلم (MBEC)



ه۱- حساسیت آنتی بیوتیکی و MBEC برای استافیلوکوکوس اورنوس جاسازی شده در بیوفیلم با استفاده از روش XTT تعیین شد.
 ه۲- اصول آزمایش XTT.

ی شمارش تعداد سلول سوماتیک



ی- انواع سلول در شمارش سلول های سوماتیک شیر

شکل ۱. مراحل انجام آزمایش در مجموع ۳۰ ایزوله استافیلوکوکوس اورنوس ورم پستان تحت بالینی گاو.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون t مستقل ($P < 0.05$) و با استفاده از برنامه SPSS جهت مقایسه روند بیماری زایی وابسته به بیوفیلیم انجام شد.

یافته‌ها

پس از انجام ارزیابی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی از استافیلوکوکوس اورئوس ورم پستان تحت بالینی، تعداد ۳۰ ایزوله برای برآورد قابلیت تشکیل بیوفیلیم، الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک و روند بیماری زایی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج مطالعه تشکیل بیوفیلیم نشان داد که تمام ایزوله‌ها (۱۰۰٪) توانایی تولید بیوفیلیم را دارند، و از نظر درجه تشکیل بیوفیلیم، ۷۷/۴٪ آنها

بیوفیلیم قوی تشکیل دادند، و ۱۲/۹٪ و ۹/۷٪ به ترتیب بیوفیلیم متوسط و ضعیف تولید کردند. فراوانی ژن‌های کدکننده بیوفیلیم در این ایزوله‌ها مشخص کرد که *icaD* با فراوانی ۷۵٪، بیشترین تکرار را در ایزوله‌ها داشته، و ژن‌های *bap* *fnbB* *fnbA* و *icaA* به ترتیب دارای فراوانی ۴۳/۸٪، ۳۱/۲٪، ۲۵٪ و ۹/۴٪ بودند. فراوانی ژن‌های *icaD* *fnbB* *fnbA* در مقایسه با ژن‌های *bap* و *icaA* به طور معنی داری ($P < 0.0001$) بیشتر بود. تمامی ایزوله‌های دارای ژن *icaA* و *icaD* بیوفیلیم قوی تشکیل دادند (جدول ۲).

جدول ۲- مقادیر حداکثر، متوسط و حداکثر تعداد سلول‌های سوماتیک، درجه تشکیل بیوفیلیم و حضور ژن‌های بیوفیلیم

Gene	Prevalence		SCC			Biofilm		
	N	%	Minimum	Median	Maximum	Strong	Medium	Weak
<i>icaA</i>	۳	۱۰	۲۴۶,۶۶۷	۷۰۳,۳۳۳	۹۳۰,۰۰۰	۳	-	-
<i>icaD</i>	۲۴	۸۰	۱۶۹,۲۶۳	۵۲۶,۱۵۸	۱,۰۷۱,۱۰۲	۲۴	-	-
<i>fnbA</i>	۱۴	۴۶,۷	۱۵۸,۳۷۵	۴۸۵,۳۷۴	۹۹۲,۸۲۰	۱۰	۴	-
<i>fnbB</i>	۷	۲۳,۳	۱۶۶,۶۲۶	۵۱۴,۳۳۳	۷۵۸,۷۵۰	۶	-	۱
<i>bap</i>	۸	۲۶,۷	۱۲۰,۳۱۳	۳۵۵,۴۳۸	۷۱۲,۸۱۳	۵	۲	۱

شناسایی شد. بالاترین میزان مقاومت در برابر پنی سیلین، و کمترین میزان مقاومت سفیتوفور و سیپروفلوکساسین مشاهده شد (جدول ۳). MIC_{50} سفیتوفور به ترتیب ۱ و ۲ $\mu g/ml$ برای *ATCC 29213* *Staphylococcus aureus* و ایزوله‌ها به دست آمد (جدول ۳). نتایج MBEC برای بیوفیلیم باکتریایی در جدول ۳ ذکر شده است.

الگوی مقاومت به آنتی بیوتیکی با آزمایش DAD، به شرح پنی سیلین (۷۴/۴٪)، جنتامایسین (۲/۳٪)، سفیتوفور (۰٪)، آمپی سیلین (۵۷/۵٪)، اریترومایسین (۳۳/۳٪)، تریمتوپریم/سولفامتوکسازول (۱۰٪)، تتراسایکلین (۷۰/۳٪)، کلرامفنیکل (۲/۳۰٪)، سیپروفلوکساسین (۰٪)، انروفلوکساسین (۶/۶٪)

جدول ۳- فراوانی الگوهای ژنوتیپی، درجه تشکیل بیوفیلم و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی

Gen Profile	Antibiotic Resistant (DAD Test)										Ceftiofur MIC ⁺	Ceftiofur MBECs ⁺⁺
	Penicillin	Gentamicin	Ceftiofur	Ampicillin	Erythromycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Ciprofloxacin	Enrofloxacin	Trimethoprim / Sulfamethoxazole		
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, bap, nuc</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, bap, nuc</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, bap, nuc</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, nuc</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbB, nuc</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbB, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbB, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbB, nuc</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>fnbA, bap, nuc</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Se	Re
<i>fnbA, bap, nuc</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>bap, nuc</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Se	Su
<i>nuc, fnbB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Se	Su
<i>icaA, icaD, fnbA, nuc</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	Se	Re
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	Se	Re
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Se	Re
<i>icaD, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaA, icaD, fnbB, nuc</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	In	Re
<i>icaD, bap, nuc</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, bap, nuc</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, fnbB, nuc</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaD, fnbA, fnbB, nuc</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Se	Re
<i>icaA, icaD, nuc</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>fnbA, nuc</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	Se	Re
<i>fnbA, nuc</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Se	Re

⁺ Se: Sensitive and in: Intermediate; ⁺⁺ Su: Susceptible and Re: Resistant.

بیشتر از آنهایی بود که ژنهای *fnbB* و *bap* کد می کردند ($P < 0.05$). جدول ۴ داده‌های مربوط به فراوانی ژنهای کدکننده بیوفیلم، را به همراه درجه تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد.

۲۸ ایزوله در حالت بیوفیلم به سفتیوفور مقاوم بودند. درحالی که این ایزوله‌ها در حالت پلانکتونی به سفتیوفور حساس هستند. تعداد سلول‌های سوماتیک در کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی استافیلوکوکوس اورئوس با توانایی تولید بیوفیلم با درجه قوی، نسبت به کارتیه‌ها با توانایی تولید بیوفیلم متوسط و ضعیف به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.05$). جدول ۲ اطلاعات مربوط به ارتباط بین سلول‌های سوماتیک با حضور ژنهای کدکننده بیوفیلم را نشان می‌دهد. میانگین تعداد سلول‌های سوماتیک برای ایزوله‌هایی که ژنهای *icaD*، *fnbA* و *icaA* را داشتند

نقش ژن بیوفیلیم در مقاومت آنتی بیوتیکی و پاتوژنز ورم پستان استافیلوکوکوس اورئوس . ۱۰۷

جدول ۴- فراوانی پروفایل ژنتیکی ایزوله‌ها با تمرکز بر ژن‌های کدکننده بیوفیلیم با درجه تشکیل بیوفیلیم

Genetic Profile	No.	%	Biofilm Grade	Maximum	Median	Minimum
<i>icaA, icaD, fnbB</i>	۱	۳,۳	S	۲۸۰,۰۰۰	۹۰۰,۰۰۰	۱,۰۰۰,۰۰۰
<i>icaA, icaD, fnbA</i>	۱	۳,۳	S	۳۰۰,۰۰۰	۶۹۰,۰۰۰	۱,۱۰۰,۰۰۰
<i>icaA, icaD</i>	۱	۳,۳	S	۱۶۰,۰۰۰	۵۲۰,۰۰۰	۶۹۰,۰۰۰
<i>icaD, fnbB</i>	۳	۱۰	S	۹۳,۰۰۰	۴۹۰,۳۳۳	۸۰۵,۰۰۰
<i>icaD, fnbA, bap</i>	۴	۱۳,۳	S	۲۱۶,۷۵۰	۴۶۵,۷۵۰	۹۳۹,۲۵۴
<i>icaD, fnbA, fnbB</i>	۲	۶,۷	S	۱۸۷,۵۰۰	۵۳۰,۰۰۰	۹۱۰,۰۰۰
<i>icaD, fnbA</i>	۳	۱۰	S	۱۸۲,۰۰۰	۴۳۷,۳۳۳	۱,۰۱۵,۶۷۷
<i>icaD</i>	۸	۲۶,۷	S	۳۱۳,۸۵۷	۶۲۲,۲۵۰	۹۹۰,۰۰۰
<i>icaD, bap</i>	۱	۳,۳	S	۱۹۰,۰۰۰	۵۸۰,۰۰۰	۹۹۰,۰۰۰
<i>fnbA</i>	۲	۶,۷	M	۸۶,۰۰۰	۴۶۵,۰۰۰	۸۵۱,۰۰۰
<i>fnbA, bap</i>	۲	۶,۷	M	۷۸,۰۰۰	۴۲۴,۰۰۰	۷۴۱,۰۰۰
<i>fnbB</i>	۱	۳,۳	W	۱۰۶,۰۰۰	۲۳۷,۰۰۰	۵۲۰,۰۰۰
<i>bap</i>	۱	۳,۳	W	۹۹,۰۰۰	۱۵۲,۰۰۰	۳۸۱,۰۰۰

* S: Strong, M: Moderate and W: Weak

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یک بیماری پرهزینه در صنایع لبنی است. افزایش ایزوله‌های مقاوم به دارو، مسئله مهمی در کنترل ورم پستان است و توانایی تشکیل بیوفیلیم نقش بالقوه‌ای در بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد و از آن به عنوان یک عامل حدت یاد می‌شود (۲۲). نتایج آزمایش تشکیل بیوفیلیم نشان داد که تمام ایزوله‌ها، توانایی تولید بیوفیلیم را دارند، که ۷۷/۴٪ از آنها بیوفیلیم‌های قوی، ۱۲/۹٪ و ۹/۷٪ به ترتیب بیوفیلیم متوسط و ضعیف تولید می‌کنند، که با نتایج مطالعه Melo (۲۲) همخوانی دارد. این مطالعه، میزان فراوانی ژن‌های *icaD* *fnbA* *fnbB* و *bap* به ترتیب ۷۵، ۴۳، ۳۱، ۲ و ۲۵ و ۹،۴ درصد نشان داده شد. به طور مشابه، بیشترین فراوانی ژن‌های *icaD* در مطالعه Ahmed (۶۰٪) (۲۳) و Salina (۸۳٪) (۲۴) نیز نشان داده شده است. در مطالعه Costa و همکاران [۲۵]، ژن *icaD* در بین تمام ژن‌های شناسایی شده بیشترین فراوانی را داشته است (۳۶/۸۴٪). در مطالعه حاضر ۲۵٪ از ایزوله‌ها، دارای ژن *bap* بودند، که از مطالعه Salina (۲۴) و همکاران کمتر بود (۵۸٪). فراوانی متوسط ژن *fnbA* توسط Khoramian

همکاران (۲۶) (۵۸٪) و Ghasemian و همکاران (۵۶٪) (۲۷) گزارش شد، که در مقایسه با نتیجه این پژوهش بالاتر بود. توانایی استافیلوکوکوس اورئوس در تولید بیوفیلیم مسئول ایجاد عفونت مداوم می‌باشد و *icaA* و *icaD* دارای نقش قابل توجهی در تشکیل بیوفیلیم هستند (۱۷). در مطالعه حاضر، تمام ایزوله‌ها تولید کننده بیوفیلیم بوده و ۷۵٪ از آنها دارای ژن *icaD* بودند. با این حال، میزان شیوع ژن‌های *icaA* و *icaD* در مطالعات مختلف بسیار متفاوت است (۲۸، ۲۹). مطالعات نشان داده تشکیل بیوفیلیم تحت تأثیر چندین عامل می‌باشد (۳۰، ۳۱). با توجه به نتیجه این مطالعه که در آن تمام ایزوله‌های تولید کننده بیوفیلیم قوی دارای ژن‌های *icaA* بودند و ژن‌های *fnbA* *fnbB* و *bap* در همه درجات بیوفیلیم‌های شناسایی شده (قوی، متوسط و ضعیف) شیوع داشتند، ممکن است نشان دهد که تشخیص ژن‌های *ica* برای پیش بینی درجه بیوفیلیم بسیار مهمتر از خود تشکیل بیوفیلیم است. به دلیل استفاده فراگیر از این آنتی‌بیوتیک‌ها، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گسترده‌ای در این مطالعه شناسایی شد. به دلیل استفاده فراگیر از این پنی‌سیلین و تتراسایکلین در گاوداری‌ها، میزان مقاومت به پنی‌سیلین (۷۴/۴٪) و

نتیجه گیری

ایزوله‌هایی که دارای *icaA* و *icaD* هستند، می‌توانند بهتر ساختار ماتریس بیوفیلمی مناسبی را تشکیل دهند، بنابراین این یک ماندگاری کارآمدتری را برای میکروارگانیسم فراهم کنند. در نتیجه، ممکن است غده پستانی، واکنش شدیدتری برای از بین بردن عوامل اعمال کند. وجود ترکیبی از این ژن‌ها حتی باعث می‌شود که طیف وسیعی از امکانات برای افزایش مقاومت را در بافت میزبان ایجاد کند. مطالعات در مورد جنبه‌های مولکولی میکروارگانیسم‌های مسبب ورم پستان گاوی، باید افزایش یابد تا عوامل موثر در پاتوژن این بیماری، بهبود مکانیسم‌های شناسایی میکروارگانیسم‌های بیماریزا و ایجاد استراتژی‌های درمان و کنترل ورم پستان بهبود یابد.

منابع

- 1) Ganaie, M. Y., Qureshi, S., Kashoo, Z., Wani, S. A., Hussain, M. I., Kumar, R., Maqbool, R., Sikander, P., Banday, M. S., Malla, W. A., Mondal P., Khan, R. I. N. (2018). Isolation and characterization of two lytic bacteriophages against *Staphylococcus aureus* from India: newer therapeutic agents against Bovine mastitis. *Veterinary research communications*. **4**: 289-295.
- 2) Shah, M. S., Qureshi, S., Kashoo, Z., Farooq, S., Wani, S. A., M. Hussain, M. I., Banday M.S., Khan, A. A., Gull, B., Habib, A., Khan, S. M., Dar, B. A. (2019). Methicillin resistance genes and in vitro biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. **64**: 117-124.
- 3) Ren, Q., Liao, G., Wu, Z., Lv, J., & Chen, W. (2020). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China.

تتراسایکلین (۷۰/۳٪) در این پژوهش بالا گزارش شد، که با نتایج مطالعات Gao (۳۲) و Jamali (۳۳) همخوانی داشت. الگوی مقاومت به اریترومايسين (۳۳/۳٪) با مطالعه Ren همراستا بود. میزان مقاومت به تریمتوپریم (۱۰٪) و بالاتر از مطالعه Aslantaş (۳۴) بود. شیوع مقاومت در برابر آنروفلوکساسین (۶/۶٪) تعیین شد که بیشتر از مطالعه Aslantaş و همکاران (۳۴) بود. مقاومت به جنتامایسین (۲،۳٪) که با مطالعه Ren و همکاران متناقض بود. در تضاد با این مطالعه، سطح بالایی از مقاومت به کلرامفنیکل (۲،۳٪) توسط Liu و همکاران (۳۱) توصیف شد. و میزان مقاومت به اریترومايسين (۳۳٪) کمتر از میزان تشخیص Liu و همکاران (۳۱) بود. با توجه به ایزوله‌های مقاوم در برابر چند دارو و ناسازگاری در میزان مقاومت ضد میکروبی در مطالعات متعدد، میتوان نتیجه گرفت که انتخاب آنتی‌بیوتیک باید مبتنی بر منطقه باشد. مقادیر MIC سفتیوفور در سلولهای پلانکتونی استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه نشان دهنده نقطه شکست حساس (۹۶،۶۷٪)، متوسط (۳،۳٪) و مقاوم (۰٪) بود. از آنجایی که تعداد سلول‌های سوماتیک در کارته‌های مبتلا به ورم پستان تحت بالینی استافیلوکوکوس اورئوس با توانایی تولید بیوفیلم با درجه قوی، نسبت به کارته‌ها با توانایی تولید بیوفیلم متوسط و ضعیف به طور معنی‌داری بالاتر بود. تمامی ایزوله‌ها با بیوفیلم قوی دارای ژن‌های *icaD* و *icaA* بودند، می‌توان گفت وجود ترکیبی از ژن‌های *icaA* و *icaD* در مقایسه با سایر ترکیبات ژن موجود در این مطالعه، می‌تواند نشان دهد که وقوع این مشخصات ژنتیکی با افزایش شدت روند التهابی همراه است.

- of Sciences of the United States of America*. **4**: 1281-1286.
- 10) Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine*. **1**: 175-188.
 - 11) Cramton, S. E., Ulrich, M., Go□tz, F., Do□ring, G. (2001). Anaerobic Conditions Induce Expression of Polysaccharide Intercellular Adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*. **6**: 4079-4085.
 - 12) Tormo, M. A., Knecht, E., Götzt, F., Lasa, I., Penadés, J. R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*. **7**: 2465-2475.
 - 13) Fatholahzadeh, B, Emaneini, M., Feizabadi, M. M., Sedaghat, H., Aligholi, M., Taherikalani, M., Jabalameli, F. (2009). Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *International journal of antimicrobial agents*. **3**: 264-265.
 - 14) Sahebkhari, N., Nochi, Z., Eslampour, M., Dabiri, H., Bolfion, M., Taherikalani, M., Khoramian, B., Zali, M., Emaneini, M. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. **2**: 113-121.
 - 15) Baldassarri, L., Bertuccini, L., Ammendolia, M. G., Arciola, C. R., Montanaro, L. (2001). Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **5**: 343-345.
 - 16) Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F. *Journal of dairy science*. **4**: 3368-3380.
 - 4) Varela-Ortiz, D. F., Barboza-Corona, J. E., González-Marrero, J., León-Galván, M. F., Valencia-Posadas, M., Lechuga-Arana, A. A., Sánchez-Felipe, C. G., Ledezma-García, F., Gutiérrez-Chávez, A. J. (2018). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. *Veterinary research communications*. **3**: p. 243-250.
 - 5) Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., Go□tz, F. (1999). The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infection and Immunity*. **10**: 5427-5433.
 - 6) Christner, M., Franke, G. C., Schommer, N. N., Wendt, U., Wegert, K., Pehle, P., Kroll, G., Schulze, C., Buck, F., Mack, D., Aepfelbacher, M., Rohde, H. (2010). The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular Microbiology*. **1**: 187-207.
 - 7) Melchior, M.B., Fink-Gremmels, J., Gaastra, W. (2007). Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Veterinary Microbiology*. **1**: 141-149.
 - 8) Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, M., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **4**: 322-332.
 - 9) Periasamy, S., Joo, H., Duong, A. C., Bach, T. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y. C., Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy*

- Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. **1**: 119-124.
- 23) Ahmed, D. M., Abdel Wahab Abel Messih, M., Ibrahim, N. M., Meabed, M. H., Abdel-Salam, S. M., (2019). Frequency of icaA and icaD determinants and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci associated with nasal carriage in neonatal intensive care units. *Germs*. **2**: 61.
- 24) Salina, A., Guimarães, F. F., Pereira, V. B., Menozzi, B. D., Rall, V. L. M., Langoni, H. (2020). Detection of icaA, icaD, and bap genes and biofilm production in Staphylococcus aureus and non-aureus staphylococci isolated from subclinical and clinical bovine mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **3**: 1034-1038.
- 25) Costa, F. N., Belo, N. O., Costa, E. A., Andrade, G. I., Pereira, L. S., Carvalho, I. A., Santos, R. L. (2018). Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in Staphylococcus aureus isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical animal health and production*. **5**: 1089-1097.
- 26) Khoramian, B., Jabalameli, F., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M., Emaneini, M. (2015). Comparison of virulence factors and biofilm formation among Staphylococcus aureus strains isolated from human and bovine infections. *Microbial pathogenesis*. **88**: 73-77.
- 27) Ghasemian, A., Peerayeh, S. N., Bakhshi, B., Mirzaee, M. (2016). Comparison of biofilm formation between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of Staphylococcus aureus. *Iranian biomedical journal*. **2**: 175.
- 28) Campoccia, D., Speziale, P., Ravaioli, S., Cangini, I., Rindi, S., Pirini, V., (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. **8**: 891-899.
- 17) 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*. **3**: 241-247.
- 18) Pfaller, M. A., Jones, R. N., Walter, D. H. (2001). Proposed quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards susceptibility tests using the veterinary antimicrobial agent tiamulin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. **2**: 67-70.
- 19) Amorena, B., Gracia, E., Monzón, M., Leiva, J., Oteiza, C., Pérez, M., Alabart, J., Hernández-Yago, J. (1999). Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus aureus in biofilms developed in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **1**: 43-55.
- 20) Pettit, R. K., Weber, C. A., Kean, M. J., Hoffmann, H., Pettit, G. R., Tan, R., Franks, K. S., Horton, M. L. (2005). Microplate Alamar blue assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **7**: 2612-2617.
- 21) Sepandj, F., Ceri, H., Gibb, A., Read, R., Olson, M. (2004). Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. *Peritoneal dialysis international*. **1**: 65-67.
- 22) Melo, P. C., Ferreira, L. M., Filho, A. N. (2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by

- Montanaro, L., Arciola, C. R. (2009). The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesin gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopedic implant infections. *Biomaterials*. **3**: 6621-6628.
- 29) Vautor, E., Abadie, G., Pont, A., Thiery, R. (2008). Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Veterinary microbiology*. **4**: 407-411.
- 30) Vijayakumar, k., Manigandan, V., Jeyapragash, D., Bharathidasan, V., Anandharaj, B., Sathya, M. (2020). Eucalyptol inhibits biofilm formation of *Streptococcus pyogenes* and its mediated virulence factors. *Journal of Medical Microbiology*. **11**: 1308-1318.
- 31) Liu, Y., Zhang, J., Ji, Y. (2020). Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Science progress*. **1**: 1308-1318.
- 32) Gao, J., Ferreri, M., Yu, F., Liu, X., Chen, L., Su, J., Han, B. (2012). Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. *The Veterinary Journal*. **3**: 550-552.
- 33) Jamali, H., Radmehr, B., Ismail, S. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of dairy science*. **4**: 2226-2230.
- 34) Aslantaş, Ö., Demir, C. (2016). Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *Journal of dairy science*. **11**: 8607-8613.