"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2021.1937204.1317**

Antibiotic resistance pattern and presence of biofilm producing *ica* operon virulence genes in coagulase positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in East Azerbaijan province

Salehi, S.[1], Anzabi, Y.[2*], kaveh, A.A[3]

1- D.V.M Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author's email: anzabi@iaut.ac.ir
(Received: 2021/08/05 Accepted: 2021/11/22)

Abstract

Staphylococcal mastitis is one of the most important diseases in industrial livestock and Staphylococci capable of producing biofilm, micro and macro abscesses, are considered to be the cause of malignant mastitis which result in culling of dairy cattle. The ability of these bacteria to produce biofilm depends on the presence of *ica* operon genes (*ica*A, *ica*B, *ica*C, *ica*D and icaR) and also some environmental factors. In the present study, the pattern of antibiotic resistance and the presence of operon *ica* virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis was investigated. According to the findings of microbiological and simplex PCR tests, it was determined that in the farms tested in East Azerbaijan province, Staphylococcal mastitis has a relatively high prevalence and among the relevant isolates, a relatively high percentage of them contain a variety of operon *ica* virulence genes that encode the ability to produce biofilm. Also, the results of antibiotic susceptibility testing performed on these isolates showed that they were more resistant to most of the antibiotics tested. Due to the high presence of *ica* operon genes, especially genes such as *ica*A and *ica*D, which result in production of stronger and excessive biofilm as well as increased resistance to various antibiotics, the results of the present study therefore indicate an unfavorable prognosis regarding the success of antibiotic treatment of staphylococcal mastitis in livestock farms in the region.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Biofilm, Cow mastitis, *ica* operon, Positive coagulase, *Staphylococcus aureus*.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2021.1937204.1317

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های حدت اپرون *ica* (مولد بیوفیلم) در *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های کواگولاز مثبت جداشده از موارد ورم پستان گاوی در استان آذربایجان‌شرقی

سعید صالحی[۱]، یونس انزابی[۲*]، امیرعلی کاوه[۳]

۱- دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۳- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: anzabi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۵/۱۴ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۹/۱)

چکیده

ورم‌پستان‌های استافیلوکوکی از جمله بیماری‌های مهم در دامداری‌های صنعتی می‌باشند و استافیلوکوک‌هایی که قادر به تولید بیوفیلم، میکروآبسه و ماکروآبسه هستند، عامل ورم پستان بددرمان تلقی شده و سبب حذف گاوها می‌شوند. توانایی تولید بیوفیلم توسط باکتری‌های مذکور بستگی به وجود ژن‌های حدت اپرون *ica* (*icaA*، *icaB*، *icaC*، *icaD* و *icaR*) و همچنین برخی فاکتورهای محیطی دارد. در تحقیق حاضر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نیز وجود ژن‌های حدت اپرون*ica* در *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های جداشده از موارد ورم پستان گاوی بررسی شد. با توجه به یافته‌های به‌دست آمده از آزمایشات میکروبیولوژیکی و simplex PCR مشخص گردید که در گاوداری‌های مورد آزمایش در استان آذربایجان شرقی، ورم پستان استافیلوکوکی شیوع نسبتا بالائی داشته و در میان جدایه‌های مربوطه، درصد نسبتاً بالائی از آن‌ها دارای انواعی از ژن‌های حدت اپرون *ica* هستند که توانایی تولید بیوفیلم را کد می‌کنند. همچنین نتایج آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی انجام‌شده در مورد جدایه‌های مذکور نشان‌دهنده مقاومت بیش از پیش آن‌ها نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش بود. با توجه به این‌که بالا بودن میزان حضور ژن‌های اپرون *ica* مخصوصاً ژن‌هایی چون *icaA* و *icaD* منجر به تولید بیوفیلم قوی‌تر و بیشتر شده و نیز مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف هم افزایش می‌یابد. لذا، نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده پیش‌آگهی نامناسبی در خصوص موفقیت درمان آنتی‌بیوتیکی ورم‌پستان‌های استافیلوکوکی در دامداری‌های منطقه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: *استافیلوکوکوس اورئوس*، **کواگولاز مثبت، ورم پستان گاو، اپرون *ica*، بیوفیلم.**

مقدمه

ورم‌پستان به التهاب غده پستانی بدون توجه به علت آن اطلاق می‌شود که به وسیله تغییرات فیزیکی، شیمیایی و میکروبی شیر و تغییرات در بافت غده پستان مشخص می‌شود. عفونت‌های پستانی در گاو و کاهش مقاومت این حیوان نسبت به عوامل بیماری‌زا منجر به بروز فرم حاد و بالینی تورم پستان شده و این عارضه به عنوان یکی از مسائل مهم در پرورش گاو به شمار می‌رود (Bradley, 2002). تحریک سیستم ایمنی و دفاعی پستان در نتیجه تهاجم باکتری‌ها به غدد پستان، سبب واکنش‌های التهابی می‌گردد. مهم‌ترین تغییراتی که در نتیجه ورم پستان در شیر ایجاد می‌شود، شامل تغییر رنگ، وجود لخته و پیدایش تعداد زیادی لکوسیت همراه با علائم تورم، گرمی، درد و سفت شدن غدد پستانی است که هم در دوران شیرواری و هم دوران خشکی، پستان‌های دام را می‌تواند مبتلا کند (Holtenius *et al*., 2004). گزارش شده که انواع تورم پستان می‌توانند حتی بر باروری دام‌ها نیز اثرات نامطلوبی برجای بگذارند.

معمول‌ترین روش درمانی ورم پستان‌ها که درحال حاضر هم کاربرد بالائی دارد، استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها است که هرچند این روش درمانی به نظر می‌رسد که اثرات خوبی دارد، ولی در همه موارد، پاسخ درمانی مناسب نداشته است (Beaudeau *et al*., 1995). باکتری‌های اصلی ایجادکننده ورم‌پستان را به ۲ دسته عوامل واگیردار نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *مایکوپلاسما بویس* و عوامل بینابینی و محیطی نظیر *اشریشیاکولای*، *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه*، *استرپتوکوکوس یوبریس* و *کورینه‌باکتریوم بویس* تقسیم‌بندی می‌کنند (Phuektes *et al*., 2001). در این بین، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به‌عنوان مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم‌پستان واگیردار در گاو، نقش مهمی در کاهش تولید شیر، افت کیفیت شیر و حذف اجباری و زود هنگام دام‌ها از گله را دارا هستند (Anzabi and Shaghaghi, 2015). با توجه به تنوع عوامل باکتریائی ایجادکننده ورم پستان، الزاماً باید توجه گردد که برای درمان موفق هر نوع از اورام پستان، در قدم اول، بایستی ابتدا نوع باکتری مولد ورم پستان را شناسایی کرد و سپس آنتی‌بیوتیک موثر بر جدایه مذکور را تجویز نمود (Holtenius *et al*., 2004).

استافیلوکوکوس اورئوس در واقع یک جرم بیماری‌زای فرصت‌طلب می‌باشد که موجب عفونت‌های مختلف در انسان و حیوانات و مخصوصاً ورم‌پستان واگیردار در گاوها می‌شود. حدت این باکتری با توانایی تولید توکسین‌ها و فاکتورهای خارج سلولی مثل تولید بیوفیلم که توانایی چسبیدن به سطوح و نیز مقاومت در برابر بیگانه‌خواری سیستم ایمنی میزبان را به باکتری می‌دهد، در ارتباط است. در واقع توانایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در تشکیل بیوفیلم، به زنده ماندن این باکتری در درون میزبان کمک ویژه‌ای می‌کند. علاوه براین، تولید بیوفیلم منجر به ماندگاری بیشتر باکتری در بدن و ایجاد عفونت مزمن می‌شود که در نتیجه تعداد حاملین باکتری افزایش می‌یابد (Quinn, *et al*., 2011). از طرف دیگر نشان داده‌اند که تولید

بیوفیلم باعث افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک های تجویزی و هم‌چنین مکانیسم‌های دفاعی میزبان می‌شود (Phuektes *et al.*, 2001). شناخت ویژگی‌های تولید و رشد بیوفیلم و جنبه‌های مختلف تشکیل آن برای درمان موفقیت آمیز عفونت‌های باکتریائی مهم می‌باشد. تشکیل بیوفیلم معمولاً فرایندی دو مرحله‌ای است که شامل اتصال به سطوح، رشد، تکثیر و گسترش باکتری‌ها به شکل چند لایه می‌باشد. مرحله اخیر توسط پلی‌ساکارید چسبنده بین‌سلولی یا PIA (intercellular adhesion polysaccharide) که پروتئین‌های عوامل اتصالی بین سلولی یا ECA (entrobacterial common antigen)، که شامل ECAA، ECAB، ECAC و ECAD می‌باشند و در تولید آن دخالت دارند، واسطه‌گری می‌شود. البته باید توجه داشت که در کنار PIA مواد دیگری همچون اسید تیکوئیک و پروتئین سطحی استافیلوکوکی 1 (staphylococcal surface protein 1; SSP 1)، پروتئین مرتبط با تجمع (accumulation associated protein; AAP)، پروتئین مرتبط با بیوفیلم (Biofilm Associated Protein; BAP) و نوکلئوتیدهای باکتریائی نیز در ساختن بیوفیلم نقش دارند (Moori-Bakhtiari *et al.*, 2017). مشخص شده ژن‌هایی که تولید مهم‌ترین مواد تشکیل دهنده بیوفیلم (پروتئین‌ها و پلی-ساکاریدهای چسبنده) را کد می‌کنند، متعلق به اپرونی به‌نام *ica* (inter cellular adhesion gene) می‌باشند. این اپرون شامل ژن‌های حدت *ica*A,B,C,D و ژن تنظیم‌کننده *ica*R می‌باشد (Phuektes *et al.*, 2001).

از آنجا که عفونت‌های ورم پستانی و مخصوصاً موارد مزمن آن که ارتباط تنگاتنگی با تشکیل بیوفیلم دارند به سختی با درمان‌های آنتی‌بیوتیکی حذف می‌شوند و از طرف دیگر با توجه به این‌که نتایج برخی مطالعات نشان داده که در بسیاری از دامداری‌ها شیوع بالایی از باکتری‌های حاوی ژن‌های اپرون *ica* وجود دارد و لذا سویه‌های مذکور مستعد ایجاد بیوفیلم می‌باشند، بنابراین تشخیص سریع جدایه‌های دارای توانایی تولید بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، جهت اتخاذ تصمیمات درمانی و مدیریتی ضروری به نظر می‌رسد (Markey, *et al.*, 2013). لذا، هدف از انجام مطالعه حاضر این بود که ضمن جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت از شیر گاوهای تعدادی از گاوداری‌های استان آذربایجان‌شرقی با استفاده از روش‌های سنتی باکتری‌شناسی و نیز نوین مولکولی، با استفاده از روش PCR (polymerase chain reaction)، حضور ژن‌های حدت مرتبط با تشکیل بیوفیلم را هم در جدایه‌های مذکور بررسی و پس از سنجش حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها، رابطه احتمالی بین حضور ژن‌های مذکور و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها را توصیف نماییم.

مواد و روش‌ها

در مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر، طی یک دوره سه ماهه در سال ۱۳۹۸، از برخی گاوداری‌های مستقر در مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی، تعداد ۱۰۰ نمونه شیر مربوط به اواسط دوره شیردهی گاوهائی که از نظر بالینی مشکوک به ورم‌پستان عفونی تشخیص داده‌شده بودند، براساس روش نمونه‌برداری خوشه‌ای ساده و طبق استانداردهای توصیه‌شده کوئین و همکاران، جمع آوری گردید (Quinn, *et al.*, 2011).

لازم به ذکر است که بـه هنگـام نمونـه‌بـرداری، جهـت جلوگیری از آلودگی ثانویه، ابتدا کارتیه‌ها شسته می‌شـد و پس از خشک‌کردن با دستمال استریل، با الکل اتیلیک ۷۰ درجه (مرک، آلمان) ضدعفونی شده و پس از این‌که سه دوشش اول آن‌هـا دور ریختـه مـی‌شـد، حـدود ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه شیر هر یک از کارتیـه‌هـای درگیـر در لوله‌های استریل درپوش‌دار جمع‌آوری شده و در داخـل ظرف مخصوص حمل نمونه‌هـای بـالینی (cool box) و در کنار یخ خشک و در کوتاه‌ترین زمان بـه آزمایشـگاه میکـروب‌شناسـی دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انتقال داده می‌شد.

-جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس اورئـوس* کواگـولاز مثبت از نمونه‌های شیر: بدین منظور ابتدا هر نمونـه شـیر جداگانه به مدت حدود ۱۵ دقیقه در سـرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس حدود ۱ میلـی‌لیتـر از قسمت میانی رسوب حاصـله بـر روی محـیط مـانیتول سالت آگار (مرک، آلمان) منتقـل گردیـده و بـه‌صـورت چند خطی کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تا ٤٨ ساعت در گرمخانه نگه‌داری می‌شـد (Anzabi and Shaghaghi, 2015). در ادامـه، کلنی‌هـای زردرنـگ ظاهرشده در سطح محـیط مـذکور انتخـاب شـده و بـه منظور تهیه پرگنه خالص، روی محیط کشت بـلاد آگـار به‌صورت چند خطی منطقه‌ای کشت داده شده و مجـددا در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری می‌گردیـد. در نهایت بـه منظـور شناسـایی دقیـق و تعیـین هویـت جدایـه‌هـای مشـکوک بـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* کواگولاز مثبت، آزمایش‌های بیولـوژیکی و بیوشـیمیایی لازم نظیـر کاتـالاز، اکسـیداز، کوآگـولاز، OF، اوره‌آز، DNase (deoxyribonuclease) و نیـز حساسـیت بـه نووبیوسـین و باسیتراسـین مطـابق پروتکـل پیشـنهادی کوئین و همکاران انجام می‌شد (Quinn, *et al*., 2011). لازم به ذکر است که جدایه‌های به‌دست آمده بر اسـاس پروتکل ذکرشده، تـا زمـان انجـام آزمایشـات مولکـولی مورد نظر، در محیط TSB (tryptic soy broth) حـاوی ۱۵ درصد گلیسرول (هردو مرک، آلمان) و در دمای۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری می‌شدند.

-تایید مولکولی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئـوس* بـر اساس بررسی حضـور ژن ترمونوکلئـاز (*nuc*A): بـدین منظور، ابتدا نیاز به استخراج DNA از جدایه‌های مـورد آزمـایش بـود کـه مراحـل لازم بـا اسـتفاده از کیـت اختصاصـی اسـتخراج DNA بـاکتری‌هـای گـرم مثبـت (Cinna Pure–DNA Kit, Cat No. PR881614) شرکت سیناژن (تهران، ایران) انجام گردید. پس از انجام مراحـل اسـتخراج DNA، در نهایـت بـرای اطمینـان از کیفیت و کمیت DNAهای اسـتخراج شـده، از دسـتگاه نـانودرآپ (Nanodrop Scientific, USA-Thermo 1000) با توجه به نسبت چگالی نوری حاصله در طـول موج‌های ۲۸۰ و۲٦۰ نانومتر، استفاده شد. در نهایت هـم محلول روئی نمونه‌های تائید شده در این مرحله، بـرای استفاده در واکنش PCR، به لوله‌های استریل منتقل و در دمای ٤ درجه سلسیوس یخچال، تا روز بعـد، نگـه‌داری شدند.

در ادامه جهت تایید مولکولی جدایه‌های کواگولاز مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های شناسائی‌شده به روش فنوتیپی، از تکثیر ژن ترمونوکلئاز (*nuc*A) که اختصاصی باکتری مذکور می‌باشد، به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای مربوطه (جدول ۱) و برنامه چرخه دمایی ارائه‌شده توسط براکاستاد و همکاران، با اندکی

تغییر استفاده گردید. بدین منظور برنامه PCR مورد استفاده به این صورت بود که واسرشتگی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ٤ دقیقه، واسرشتگی اصلی در همان دما و به مدت ٤٠ ثانیه، اتصال پرایمر به DNA الگو در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و به مدت ٤٠ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ٤٠ ثانیه و بالاخره طویل شدن نهائی در همان دما و به مدت ۵ دقیقه انجام شد (Brakstad *et al*., 1992). لازم به ذکر است که این برنامه برای همه نمونه‌های مورد آزمایش، به تعداد ۳۰ چرخه تکرار شد. همچنین در آزمایش مولکولی ذکرشده، در چاهک مربوط به ردیف کنترل منفی، از آب مقطر دوبار تقطیر استریل به جای DNA و در چاهک ردیف کنترل مثبت، از DNA استخراج‌شده از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC=35550) به عنوان سویه استاندارد حاوی ژن *nuc*A استفاده گردید.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن ترمونوکلئاز (*nuc*A)

ژن هدف	توالی پرایمرها (3′→5′)	اندازه محصول PCR (جفت باز)	منبع
nuc A	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	۲۷۰	Brakstad *et al*., 1992

- جستجوی ژن‌های حدت اپرون *ica* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*

جهت بررسی توانائی تولید بیوفیلم که مرتبط با حضور ژن‌های حدت اپرون *ica* که شامل *ica*A,B,C,D,R می‌باشد نیز از روش PCR استفاده شد. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مربوط به ژن‌های مذکور که در جدول ۲ ارائه شده‌است، از پژوهش آرکیولا و همکاران برگرفته شد (Arciola *et al*., 2001). واکنش PCR طراحی‌شده هم با استفاده از دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف (Eppendorf--Germany) انجام گردید. جهت انجام واکنش PCR مورد نظر، ۲ میکرولیتر از DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر از آنزیم مسترمیکس Redamp و یک میکرولیتر از هر پرایمر را باهم مخلوط کرده و حجم نهایی را با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵میکرولیتر رساندیم. برنامه اجرایی PCR هم به این صورت بود که واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل واسرشتگی در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به DNA الگو برای تکثیر ژن *ica*A در دمای۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و برای تکثیر ژن‌های *ica*B و *ica*C در دمای ٦۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نیز برای تکثیر ژن *ica*D در دمای ٥٦ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه انجام می‌دادیم. همچنین برای طویل‌شدن رشته مورد نظر تکثیرشده، از دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در پایان، جهت طویل‌شدن نهایی از همان دما به مدت ۷ دقیقه استفاده شد. در نهایت، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شده و پس از انجام عمل الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۹۰ میلی‌ولت ، باندهای مشاهده شده مربوط به ژن‌های مورد نظر پس از رنگ‌آمیزی با safe stain، در دستگاه ژل داکیومنت

(Box™ gel documentation) شرکت سینژن کمبریج انگلستان و با استفاده از امواج ماوراءبنفش مورد بررسی قرار گرفت.

لازم به ذکر است که در همه آزمایشات مولکولی ذکرشده در بالا، در چاهک مربوط به ردیف کنترل منفی از آب مقطر دوبار تقطیر استریل به جای DNA و در چاهک ردیف کنترل مثبت از سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* (35550ATCC) به عنوان سویه حاد تولیدکننده قوی بیوفیلم و حاوی ژن‌های اپرون *ica* و نیز از سویه استاندارد باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (ATCC 12228) به عنوان شاهد منفی (سویه غیرحادی که توانائی تولید بیوفیلم را ندارد) استفاده شد. کلیه مراحل کارهای مولکولی مطالعه در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شد.

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای مربوط به ژن‌های اپرون *ica*

ژن‌های هدف	توالی پرایمرها (3′→5′)	اندازه محصول PCR (جفت باز)	منبع
ica A	F : ACACTTGCTGGCGCAGTCAA R : TCTGGAACCAACATCCAACA	۱۸۸	Arciola *et al*., 2001
ica B	F : AGAATCGTGAAGTATAGAAAATT R : TCTAATCTTTTTCATGGAATCCGT	۹۰۰	Arciola *et al*., 2001
ica C	F : ATGGGACGGATTCCATGAAAAAGA R : TAATAAGCATTAATGTTCAATT	۱۱۰۰	Arciola *et al*., 2001
ica D	F : ATGGTCAAGCCCAGACAGAG R : AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	۱۹۸	Arciola *et al*., 2001
ica R	F : TACTGTCCTCAATAATCCCGAA R : GGTACGATGGTACTACACTTGATG	٤٥٣	Arciola *et al*., 2001

- ارزیابی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های کواگولاز مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کنگورد آگار: کنگورد آگار روشی برای تشخیص تولید بیوفیلم (اسلایم) توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد که با اضافه کردن رنگ کنگورد به محیط پایه آگاردار (مرک، آلمان) تهیه می‌شود. در مطالعه حاضر، محیط کشت کنگورد آگار طبق پروتکل ارائه شده توسط شرکت سازنده، تهیه گردیده و در شرایط استاندارد آزمایشگاه میکروب‌شناسی، در پلیت‌های استریل با قطر ٦ سانتی‌متر آماده می‌شد. در ادامه پس از سرد شدن محیط‌های مذکور در یخچال ٤ درجه آزمایشگاهی، به وسیله لوپ از تک کلنی‌های جدایه‌هائی که قبلاً به روش فنوتیپی و ژنوتیپی تعلق قطعی آن‌ها به سویه کواگولاز مثبت باکتری *استافیلوکوکوس* اورئوس تائید شده بود، به مقدار کافی برداشت کرده و در سطح محیط‌های آماده شده کشت خطی داده می‌شد. در ادامه عمل گرمخانه‌گذاری پلیت‌های مذکور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت انجام می‌گرفت. در نهایت نتایج به شکل تولید بیوفیلم قوی با مشاهده کلنی‌های قهوه‌ای رنگ متمایل به سیاه، بیوفیلم

متوسط با مشاهده کلنی‌های قرمز مایل به بنفش تیره و بیوفیلم ضعیف یا عدم تولید بیوفیلم با مشاهده کلنی‌های قرمز رنگ بررسی و ثبت می‌شد (Vasudevan *et al.*, 2003).

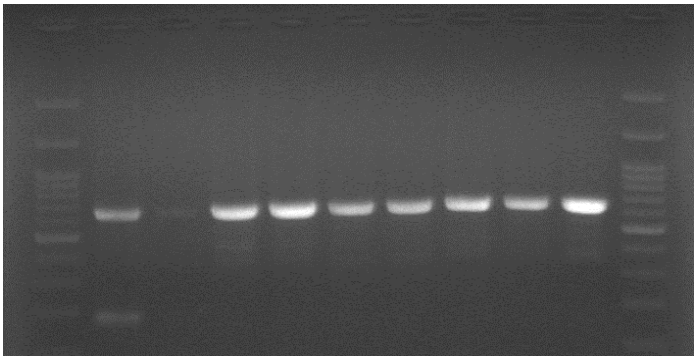
- **تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های کواگولاز مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس***: بدین منظور از دستورالعمل موسسه بین‌المللی استانداردهای آزمایشگاهی (CLSI, 2017) استفاده شد و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تحقیق حاضر، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین B، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، کلینداماسین، پنی‌سیلین، ریفامپین، فورازولیدون، تتراسایکلین، کوتریموکسازول، ونکومایسین، سفوکسیتین، اریترومایسین، جنتامایسین و سفازولین به روش انتشار دیسک در آگار (برمبنای روش کربی-بوئر) تعیین و میانگین نتایج مربوطه ثبت گردید (Peymani *et al.*, 2012).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: داده‌های کمی جمع‌آوری‌شده به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند. همچنین جهت تحلیل آماری داده‌ها از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS و برای بررسی ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها و حضور ژن‌های اپرون*ica* از روش‌های آماری T-test و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) استفاده شد. در بررسی اختلافات آماری مشاهده شده هم، مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

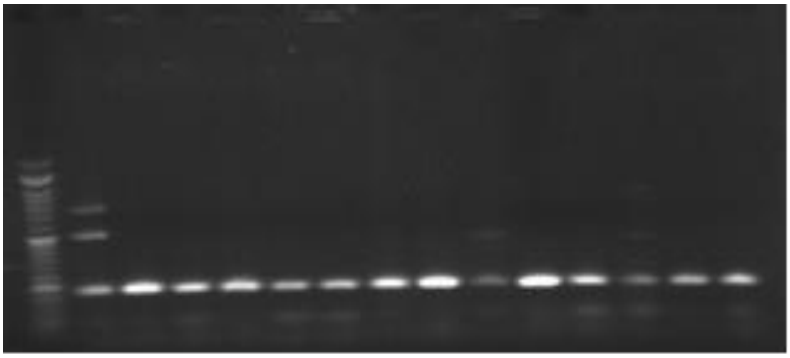
- **نتایج مربوط به جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس*های کوگولاز مثبت از نمونه‌های شیر**: جداسازی باکتری فوق از نمونه‌های شیر مربوط به گاوهای ورم‌پستانی با استفاده از روش‌های کشت اختصاصی و بر مبنای خصوصیات بیوشیمیائی و بیولوژیکی، مشخص کرد که از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر آزمایش‌شده، تعداد ۳۹ جدایه متعلق به گونه مذکور می‌باشد که از این تعداد هم، ۳۵ جدایه به آزمایش کواگولاز روی لام، جواب مثبت دادند.

- **نتایج مربوط به تائید مولکولی جدایه‌های کوگولاز مثبت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس***: نتایج مربوط به تایید مولکولی جدایه‌ها با استفاده از جستجوی ژن اختصاصی *nuc*A نیز نشان داد که همه ۳۵ جدایه مذکور، حاوی این ژن هستند. بنابراین، در ادامه آزمایش، جدایه‌های مذکور مورد استفاده قرار گرفتند. شکل ۱ نمونه‌ای از جواب‌های مشاهده در بررسی مولکولی حضور ژن *nuc*A در جدایه‌های کواگولاز مثبت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان می‌دهد.

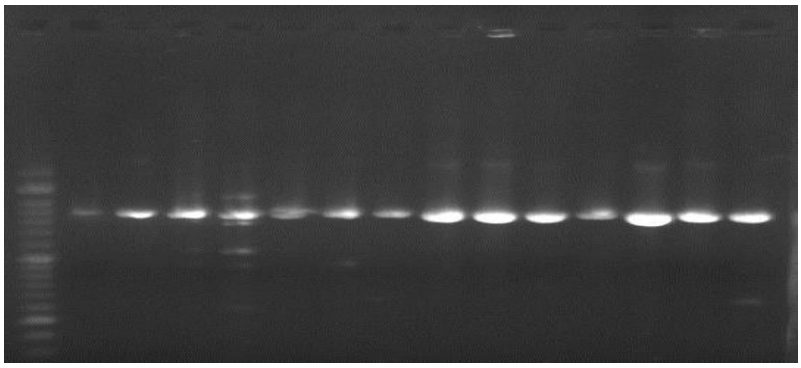


شکل ۱- ردیف‌های ۱ و ۱۱ نشان‌دهنده سایزمارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمانتز آلمان، ردیف ۲ نشان‌دهنده باند ٦٦٤ جفت بازی مربوط به باکتری کنترل مثبت (حاوی ژن*nuc*A) و ردیف ۳ هم عدم تشکیل باند در چاهک مربوط به نمونه کنترل منفی را نشان می‌دهد. بقیه ردیف‌ها نیز نمونه‌های مثبت حاوی باند ٦٦٤ جفت بازی مربوط به ژن *nuc*A را نشان می‌دهند.

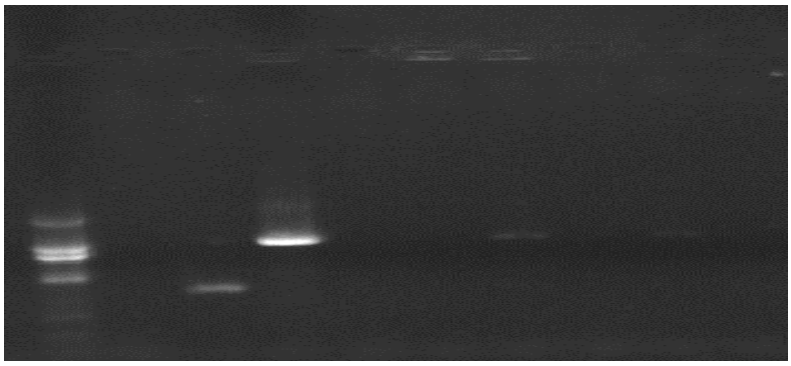
- نتایج مربوط به وجود ژن‌های اپرون *ica* در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*: مطابق نتایج مشاهده شده در اشکال ۲ تا ٦ مشخص گردید جدایه‌هایی که از نظر ژنوتیپی هم *استافیلوکوکوس‌اورئوس* کواگولاز مثبت شناسایی کرده بودیم، دارای تمامی ژن‌های اپرون *ica* نبودند، به‌طوری‌که تعداد ۳۳ جدایه (۹٤/۳ درصد آن‌ها) دارای ژن *ica*A، تعداد ۳۰ جدایه (۸۵/۷ درصد) دارای ژن *ica*B، تعداد ۳۲ جدایه (۹۱/٤ درصد) دارای ژن *ica*D و فقط ۲ جدایه که معادل ۷ درصد جدایه‌ها می‌باشند، دارای ژن *ica*R بودند. البته ۱۰۰ درصد جدایه‌های مورد آزمایش هم فاقد ژن*ica*C بودند. همچنین تعداد ۳۰ جدایه (۸۵/۷ درصد جدایه‌ها) همزمان، ژن‌های *ica*A,B,D را دارا بودند.



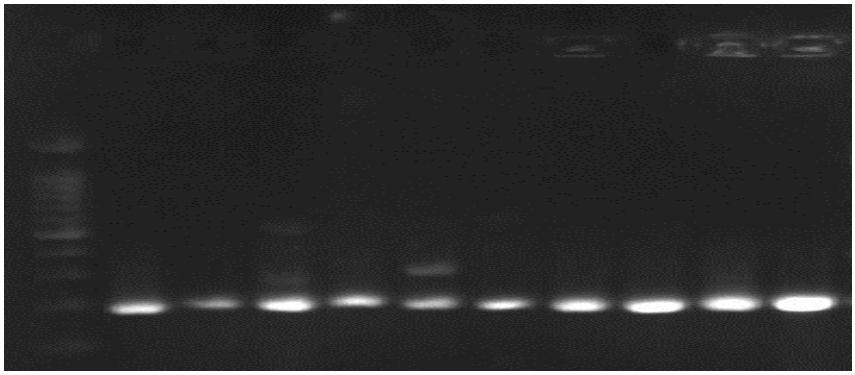
شکل ۱- چاهک ردیف ۱ نشان‌دهنده سایزمارکر ۵۰ جفت بازی شرکت فرمانتز آلمان، ردیف ۲ نشان‌دهنده باندهای اضافی موجود در چاهک کنترل منفی (احتمالاً آلوده شده) و ردیف ۳ هم تشکیل باندی به اندازه ۱۸۸ جفت باز در چاهک مربوط به کنترل مثبت (حاوی ژن *ica*A) را نشان می‌دهد. چاهک‌های بقیه ردیف‌ها هم نمونه‌های مثبت حاوی باند ۱۸۸ جفت بازی مربوط به ژن *ica*A را نشان می‌دهند.



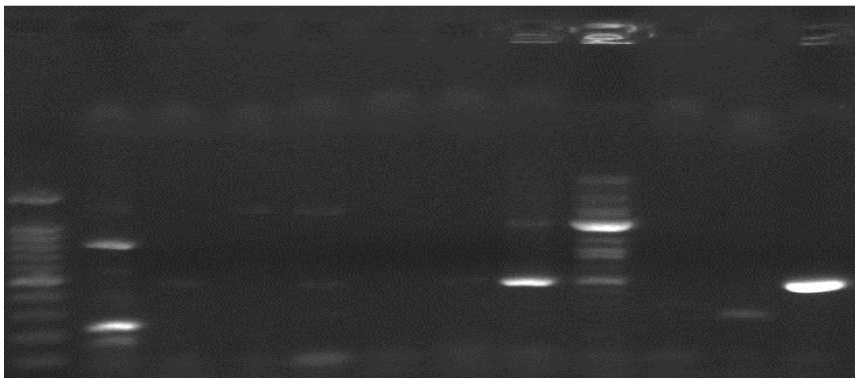
شکل ۲- چاهک ردیف ۱ نشان‌دهنده سایزمارکر ۵۰ جفت بازی شرکت فرمانتز آلمان، چاهک ردیف ۲ نشان‌دهنده باندی به اندازه ۵۲۷جفت باز مربوط به کنترل مثبت (حاوی ژن *ica*B) و ردیف‌های ۳ تا ۱۵ هم تشکیل باندی به اندازه ۵۲۷ جفت باز در چاهک‌های مربوط به نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن *ica*B در جدایه‌ها را نشان می‌دهند.



شکل ٤- چاهک ردیف ۱ نشان‌دهنده سایزمارکر ۲۰۰ جفت بازی شرکت فرمانتز (آلمان)، ردیف ۲ نشان‌دهنده چاهک کنترل منفی حاوی آب مقطر استریل (بدون ظهور باند) و نیز چاهک ردیف سوم مربوط به نمونه آلوده شده (دارای باندی نابجا و کاذب) و همچنین چاهک ردیف چهارم نشان‌دهنده باندی به اندازه ۹۳٦ جفت باز مربوط به کنترل مثبت (حاوی ژن *ica*C) می‌باشد. ردیف‌های بعدی هم مربوط به نمونه‌های آزمایش‌شده می‌باشند که همگی از نظر وجود ژن *ica*C منفی بوده و هیچ باندی را نشان نمی‌دهند.

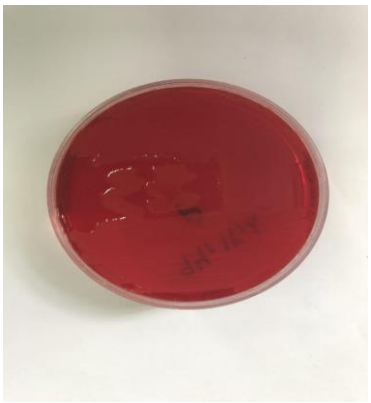


شکل ۵- چاهک ردیف ۱ نشان‌دهنده سایزمارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمانتز آلمان، چاهک ردیف ۲ نشان‌دهنده نمونه کنترل‌مثبت (حاوی ژن *ica*D) که دارای باندی به اندازه ۱۹۸ جفت باز می‌باشد. ردیف‌های ۳ تا ۱۱ هم مربوط به نمونه‌های آزمایش‌شده می‌باشند که از نظر وجود ژن *ica*D مثبت بوده و در چاهک مربوط به همه آن‌ها، باندی به اندازه ۱۹۸ جفت باز مشاهده می‌شود.



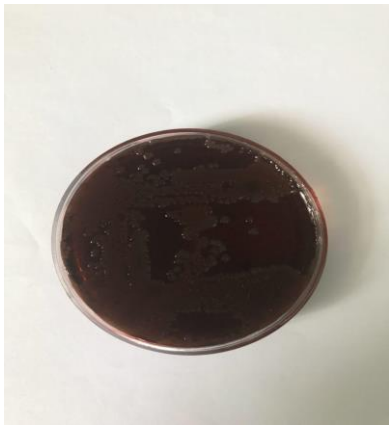
شکل ٦- چاهک‌های ردیف‌های ۱ و ۹ نشان‌دهنده سایزمارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمانتز آلمان، چاهک ردیف ۲ نشان‌دهنده نمونه کنترل منفی احتمالاً آلوده شده که دارای باندهای نابجا و کاذب می‌باشد. چاهک شماره ۸ با باندی به اندازه ٤٥٣ جفت باز نشان‌دهنده نمونه‌ای مثبت از نظر وجود ژن *ica*R بوده، ولی بقیه چاهک‌ها مربوط به نمونه‌های منفی از نظر ژن مذکور هستند که هیچ باندی را نشان نمی‌دهند. همچنین چاهک ردیف ۱۲ مربوط به نمونه کنترل مثبت (حاوی ژن *ica*R) است که حاوی باندی به اندازه ٤٥٣ جفت باز می‌باشد.

- نتایج مربوط به میزان فراوانی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های تحقیق حاضر به روش کنگورد آگار: مطابق یافته‌های مطالعه حاضر، از تعداد ۳۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت، ٦٩/٢درصد آن‌ها تولید بیوفیلم قوی، ١٥/٤ درصدشان بیوفیلم متوسط و ١٥/٤درصد بیوفیلم ضعیف تولید کردند. اشکال ۷ تا ۹ نمونه‌هائی از نتایج مذکور را نشان می‌دهند.



شکل ۷- عدم تولید بیوفیلم و یا تولید ضعیف آن توسط جدایه‌های کواگولاز مثبت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کنگورد آگار

شکل ۸- تولید بیوفیلم متوسط، توسط جدایه‌های کواگولاز مثبت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کنگورد آگار



شکل ۹- تولید بیوفیلم قوی، توسط جدایه‌های کواگولاز مثبت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به روش کنگورد آگار

- نتایج مربوط به تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کواگولاز مثبت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*: نتایج مذکور بیانگر مقاومت بیش از پیش جدایه‌های ورم پستانی مذکور، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و مورد استفاده در دامپزشکی بود، به طوری‌که فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین ۹۷ درصد، پنی‌سیلین ۹۱ درصد، ریفامپین ۹۱ درصد، تتراسایکلین ۸۸ درصد، کلیندامایسین ۸۷ درصد، اریترومایسین۸۵ درصد، فورازولیدون ۸۲ درصد، سیپروفلوکساسین ٦۲ درصد، جنتامایسین ٦۰ درصد، سفازولین ۵۷ درصد، سفوکسیتین ۵۱ درصد، کلرامفنیکل ٤۵ درصد و کوتریموکسازول ٤۲ درصد ثبت گردید.

- نتایج مربوط به ارتباط بین حضور ژن‌های اپرون*ica* و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: با توجه به نتایج آزمون آماری کای اسکوئر، ارتباط آماری معنی‌داری بین حضور ژن *ica*A در جدایه‌ها و میزان حساسیت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین یافت شد ($p<۰/۰۵$). همچنین مشخص گردید که ارتباط آماری معنی‌داری بین حضور ژن *ica*R و میزان حساسیت جدایه‌های واجد ژن مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و سیپروفلوکساسین وجود دارد ($p<۰/۰۵$). اما بین حضور بقیه ژن‌های اپرون مذکور و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، ارتباط آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از ۳۵ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت به‌دست آمده از تعداد ۱۰۰ نمونه شیر آزمایش شده، همه جدایه‌های فوق، واجد ژن *nuc*A مذکور بودند و به عنوان سویه‌ای از باکتری مذکور مورد تایید نهائی قرار گرفتند. در این ارتباط، در سال ۱۳۹۱ میرزایی و همکاران نشان دادند که ۷۳ درصد از نمونه‌های اخذشده از پنیر و ٤٦ درصد از جدایه‌های به‌دست آمده از کره که در آزمایشات

بیوشیمیایی و بیولوژیکی میکروب‌شناسی به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شده‌بودند، دارای ژن *nuc*A بودند (Mirzaei *et al.*, 2012) که مشاهده می‌شود همخوانی نسبی بین نتایج پژوهش حاضر و نتایج تحقیق مذکور وجود دارد. همچنین نتایج مشابهی در مطالعه‌ای دیگر در سال ۱۳۹۱ در تبریز به‌دست آمده است، به‌طوری‌که اثنی‌عشری و همکاران گزارش کردند که ۱۰۰ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حاصله از شیر گاومیش (شناسائی‌شده براساس روش‌های بیوشیمیایی)، دارای ژن ترمونوکلئاز *nuc*A بوده‌اند (Esnaashari *et al.*, 2012).

از طرف دیگر در مطالعه حاضر، از مجموع ۳۵ جدایه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* کواگولاز مثبت که به روش مولکولی هم تائید نهائی شده‌بودند، تعداد ۳۳ جدایه (۹٤/۳ درصد آن‌ها) دارای ژن *ica*A، تعداد ۳۰ جدایه (۸۵/۷ درصد جدایه‌ها) دارای ژن *ica*B، تعداد ۳۲ جدایه (۹۱/٤ درصد) دارای ژن *ica*D و فقط ۲ جدایه که معادل ۷ درصد جدایه‌های تحقیق حاضر می‌باشد، دارای ژن *ica*R و البته ۱۰۰ درصد جدایه‌های مورد آزمایش هم فاقد ژن *ica*C بودند. همچنین تعداد ۳۰ جدایه (۸۵/۷ درصد جدایه‌ها) همزمان، ژن‌های *ica*A,B,D را دارا بودند. در این ارتباط اهمیت ژن‌های *ica*A,D در تشکیل بیوفیلم، در یافته‌های آرکیولا و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش شده‌است (Arciola *et al.*, 2001). کرامیتون و همکاران نیز در مطالعه خود گزارش کرده‌اند که عدم تشکیل بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* ممکن است در اثر حذف ژن‌های اپرون *ica* باشد (Cramiton *et al.*, 2001). همچنین در سال ۲۰۰۹، گاد و همکاران هم طی مطالعه‌ای گزارش کردند که ۸۳ درصد از *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از سوندهای ادراری انسان، توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند و تمامی جدایه‌هایی که به صورت فنوتیپی بیوفیلم تشکیل‌داده بودند، دارای ژن‌های *ica*A,D بودند و جدایه‌هایی که از لحاظ فنوتیپی توانایی تشکیل بیوفیلم را نشان ندادند، فاقد ژن‌های اپرون *ica* بودند (Gad *et al.*, 2009). برخی از مطالعات تشکیل بیوفیلم در موارد اورام پستان استافیلوکوکی در گاو را مورد بررسی قرار داده‌است، به‌طوری که واسودوان و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کرده‌اند که در تحقیق آن‌ها، همه ۳۵ جدایه مربوط به ورم پستان ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، دارای ژن‌های اپرون *ica* بوده‌اند (Vasudevan *et al.*, 2003). همچنین کیفتسی و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کرده‌اند که تعداد ۱۵ جدایه از ۵۹ جدایه مربوط به اورام پستان دامی دارای هر دو ژن *ica*A,D، ۱٦جدایه دارای ژن *ica*A و ۳۸ جدایه نیز دارای ژن *ica*D بوده‌اند (Ciftci *et al.*, 2009). در پژوهشی، میرزایی و همکاران در سال‌های۹۲-۱۳۹۱ این گونه بیان کرده‌اند که همه سویه‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که دارای ژن‌های اپرون *ica* بودند، از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم در دو طیف قوی و متوسط قرارگرفتند و هیچ جدایه‌ای در بین آن‌ها با ویژگی عدم توانایی در تشکیل بیوفیلم مشاهده نشد (Mirzaee *et al.*, 2014). در مطالعه نوربخش و ممتاز در سال ۱۳۹۵ نیز مشخص گردیده که ۷۳ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* توانایی تولید بیوفیلم قوی داشتند و در بررسی ژنوتیپی آن‌ها مشاهده شده که ٦۷/۳ درصد جدایه‌های مذکور دارای ژن *ica*C و ٦۳/۲ درصدشان هم دارای ژن *ica*B بوده‌اند

(Nourbakhsh and Momtaz, 2016). البته در این خصوص، یافته‌های لیدوما و همکاران هم نشان داده که در تشکیل بیوفیلم، ژن‌های app و *ica*A نقش مهمی بازی می‌کنند، اما وجود این دو ژن برای تشکیل بیوفیلم کافی نیست به طوری که در تحقیق نامبردگان در سال ۲۰۱۲، در سویه‌های $ica A^{+}$ و app^{+}، توانائی تولید بیوفیلم، منفی بوده‌است (Liduma *et al.*, 2012). همچنین در مطالعه یوریو و همکاران در سال۲۰۱۱، از میان ٤٧ مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از خون، ٤٠ جدایه دارای ژن‌های اپرون *ica* بودند، ولی در آزمایش تشخیص فنوتیپی بیوفیلم، فقط ۲۵ جدایه (٦٢/٥ درصد جدایه‌ها) توانایی تولید بیوفیلم را داشتند (Iorio *et al.*, 2012). در گزارش خرمیان و همکاران در سال۱۳۸۸ نیز، ۷۹ مورد از۹۰ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*، دارای ژن‌های *ica*A و *ica*D بودند، درحالی‌که تمام جدایه‌های مذکور، در محیط آزمایشگاهی توانایی تولید بیوفیلم را نداشتند (Khoramian *et al.*, 2010). از طرف دیگر در مطالعه شاهکرمی و همکاران، ۷۰ درصد *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های تشکیل دهنده بیوفیلم، فاقد ژن‌های اپرون *ica* بودند (Shahkarami *et al.*, 2016). اما در مطالعه حاضر نتایج بررسی‌های ژنوتیپی مشخص کرد که ۹٤/۳ درصد جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای ژن *ica*A، ۸۵/۷ درصد آن‌ها دارای ژن *ica*B، ۹۱/٤ درصدشان دارای ژن *ica*D و فقط۷/۲ درصد از جدایه‌های مذکور دارای ژن *ica*R بودند. همچنین در تحقیق حاضر مشخص گردید که هیچ‌یک از *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده از شیر گاوهای ورم پستانی، واجد ژن *ica*C نبودند و نیز ۳۰/۳۵ از جدایه‌های مذکور، همزمان هر سه ژن *ica*A,B,D را دارا بودند.

در مطالعه حاضر بیشترین میزان حساسیت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول، کلرامفنیکل و سفوکسیتین و بیشترین مقاومت هم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌میکسین B، پنی‌سیلین و ریفامپین مشاهده گردید. در این ارتباط، مطالعات مختلفی در ایران و نقاط مختلف دنیا در مورد بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مختلف باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفته و اکثر این تحقیقات مشخص کرده‌اند که با توجه به تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها و بیوتیپ‌های مختلف باکتری مذکور در مناطق جغرافیایی متفاوت، می‌توان این باکتری را به عنوان یک عامل عفونی گسترده با الگوی مقاومتی متفاوت و غالبا با مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبتاً بالا در سطح فارم‌های دام و طیور و نیز بیمارستان‌ها مطرح نمود که معمولاً با تغییر شرایط جغرافیایی و منطقه مورد بررسی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متنوعی حاصل می‌گردد (Kateete *et al.*, 2010). در این خصوص، در مطالعه میرزایی و همکاران در سال ۱۳۸۹ به ترتیب ۳٤ و ٤١ درصد از جدایه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* به‌دست آمده از پنیر و کره نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین مقاوم بودند (Mirzaei *et al.*, 2012). در مطالعه نوربخش و ممتاز هم در سال ۱۳۹٤، در مورد میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشاهده‌شده در خصوص *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های بررسی‌شده، مشاهده گردیده است که ۱۰۰ درصد آن‌ها نسبت به پنی‌سیلین و نیز ۷٦ درصد جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین مقاوم بوده‌اند، در حالی که نامبردگان

مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به ونکومایسین را فقط در مورد ١٤درصد از باکتری‌های مذکور گزارش کردند (Nourbakhsh and Momtaz, 2016). همچنین در نتایج مطالعه‌ای مشابه توسط کیانی‌نیا و همکاران در سال ۲۰۱۳، مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به ونکومایسین ۱۲درصد گزارش شده‌است (Kiani-Nia *et al*., 2013) و این درحالی است که در مطالعه حاضر، مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های جدا شده از شیر گاو نسبت به ونکومایسین ٦٠ درصد ثبت شده‌است و این مسئله ضمن این‌که بیانگر افزایش بیش از پیش مقاومت سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین بوده، در عین حال عدم همخوانی با نتایج بیشتر مطالعات ذکر شده را هم نشان می‌دهد.

به‌طورکلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شاخص‌های ژنوتیپی مرتبط با توانایی تشکیل بیوفیلم، متعاقب آن با مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز مرتبط می‌باشد، چرا که مطابق نتایج ثبت‌شده در بخش یافته‌های پژوهش حاضر، فراوانی ژن‌های اپرون *ica* و همخوانی نتایج ژنوتیپی مذکور (اشکال ۲ تا ٦) با نتایج آنتی‌بیوگرام جدایه‌های مورد نظر، موید این مسئله می‌باشد. در این خصوص عقیده بر این است که توانایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در تشکیل بیوفیلم، به زنده ماندن باکتری در محیط و بدن میزبان کمک می‌کند. همچنین با توجه به تشکیل واحدهای چند لایه در ساختارهای بیوفیلم، می‌توان گسترش نمونه‌های حاوی بیوفیلم را به عنوان مرحله کلیدی و شاخص در افزایش عفونت و همچنین گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفت .گزارشاتی هم در مورد ارتباط بین خصوصیات فنوتیپی، نتایج آنتی‌بیوگرام، آزمایشات بیوشیمیایی و حضور ژن‌های اپرون *ica* در *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های جدا شده در نقاط مختلف دنیا منتشر شده‌است (Mirzaee *et al*., 2014). نظر بر این‌که بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر و اکثر پژوهش‌های مشابه مشخص می‌شود که تعداد آنتی‌بیوتیک‌های موجود و موثر برای درمان ورم پستان و نیز دیگر عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* به شدت رو به کاهش است، می‌توان نتیجه گرفت که توانایی تولید بیوفیلم و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به غیر از حضور ژن‌های حدت، می‌تواند وابسته به مسائل دیگری نیز باشد. در این راستا، طبق یافته‌های فربورق و همکاران شاید نتیجه تاثیرات محیطی مثل غلظت آنتی‌بیوتیک در بدن هنگام نمونه برداری، درجه حرارت بالا و حضور قند در این خصوص، موثر باشد (Freborg *et al*., 2000). همچنین سوزوکی و همکاران مشخص کرده‌اند که حتی مختصات آناتومیکی و فیزیولوژیکی محلی که از آنجا نمونه‌ها جدا می‌شود، می‌تواند در تشکیل بیوفیلم تاثیرگذار باشد، به‌طوری که فراوانی ژن‌های اپرون *ica* در تحقیق نامبردگان، در جدایه‌های ملتحمه چشم، ٦٠ درصد ولی در جدایه‌های پوست ۱۵ درصد بوده‌است (Suzuki *et al*., 2005). به اضافه اینکه عوامل دیگری من جمله، شرایط بافت‌های بدن میزبان، وجود یا عدم وجود ژن‌های حدت دیگر، پراکسید هیدروژن و تولید بیوفیلم از مسیرهای مستقل از PIA نیز در تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌توانند نقش داشته باشند (Stevens *et al*., 2008; Zmantar *et al*., 2010).

سپاسگزاری

نظر بر این‌که یافته‌های ارائه شده در مقاله حاضر مربوط به پایاننامه یکی از دانشجویان دکترای حرفه‌ای دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز می‌باشد، لذا نویسندگان بدین‌وسیله مراتب تشکر خود را از همه مسئولین این دانشگاه، مخصوصاً کارشناسان محترم آزمایشگاه‌ها اعلام می‌دارند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Anzabi, Y. and Shaghaghi, S. (2015). In vitro evaluation of antibacterial properties of propolis alcoholic extract on bovine mastitis isolates. Veterinary Clinical Pathology, 9(34): 117-129. [In Persian]
- Arciola, C.R., Baldassarri, L. and Montanaro, L. (2001). Pesence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections. Journal of Clinical Microbiology, 39(1): 2151-2156.
- Beaudeau, F., Ducrocq, V., Fourichon, C. and Seegers, H. (1995). Effect of disease on length of productive life of french Holstein dairy cows assessed by survival analysis. Journal of Dairy Science, 78(1): 103-117.
- Bradley, A.J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. The Veterinary Journal, 164(2): 116-128.
- Brakstad, O.G., Aasbakk, K. and Maeland, J.A. (1992). Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. Journal of Clinical Microbiology, 30(7): 1654-1660.
- Casagrande Proietti, P., Stefanetti, V., Hyatt, D.R., Marenzoni, M.L., Capomaccio, S., Coletti M., et al. Phenotypic and genotypic characterization of canine pyoderma isolates of Staphylococcusintermedius for biofilm formation. Journal of Veterinary Medicine Sciences, 77(8): 945-51.
- Ciftci, A., Findik A., Emek Onuk E. and Savasan S. (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor production of staphylococcus aureus in bovine mastitis. Brazilian Journal of Microbiology, 40(1): 254-261.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M02-A12, M07-A10 and M11-A8. M100. 27th ed., Wayne, U.S.A: Bublished by CLSI, pp: 12-16, 162-165.
- Cramiton, S.E., Gerke, C. and Gotz, F. (2001). In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation. Methods in Enzymology, 336(1): 239-255.

- Esnaashari, M., Shayegh, J. and Nasrollahi Omran, A. (2012). Prevalence of genes encoding the classical enterotoxins of Staphylococcus aureus isolated from buffalo milk in Tabriz area by multipex PCR. Journal of Food Hygiene, 2(6): 61-68.
- Frebourg, N.B., Lefebvre, S., Baert, S. and Lemeland, J.F. (2000). PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating Staphylococcus epidermidis strains. Journal of Clinical Microbiology, 38(2): 877-80.
- Gad, G.F., El-Feky, M.A., El-Rehewy, M.S., Hassan, M.A., Abolella, H. and El-Baky, R.M. (2009). Detection of icaA, icaD genes and biofilm production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis isolated from urinary tract catheterized patients. The Journal of Infection in Developing Countries, 3(5): 342-351.
- Holtenius, K., Waller, K.P., Essen-Gustavsson, B., Holtenius, P. and Sandgren, C.H. (2004). Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. The Veterinary Journal, 168(1): 65-73.
- Iorio, N.L., Lopes, A.P., Schuenck, R.P., Barcellos, A.G., Olendzki, A.N., Lopez, G.L., *et al*. (2011). A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of Staphylococcus in blood cultures. Microbiology and Immunology. 55(1): 28-33.
- Kateete, D.P., Kimani, C.N., Katabazi, F.A., Okeng, A., Okee, M.S., Nanteza, A., et al. (2010). Identification of Staphylococcus aureus: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 9(1): 23-24.
- Khoramian, B., Emaneini, M.E., Bolourchi, M., Eslampour, M.A., Niasari-Naslaji, A., Aligholi, M., et al. (2010). Evaluation of the biofilm-forming ability of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis in Iran. Journal of Comprative Pathobiology, 6(4): 109-114.
- Kiani-Nia, M., Hasani, A., Hasani, A., Sharifi, Y., Ahmadi, S.M. and Deghani, L. (2013). Investigation and Identification of the nuc, femB, mecA and aac (6′)/aph(2″)-Ia genes in the Staphylococcus aureus isolated from Northwest Iran by Multiplex PCR method. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services, 35(1): 68-73. [In Persian]
- Liduma, I., Tracevska, T., Bers, U. and Zilevica, A. (2012). Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by Staphylococcus epidermidis. Medicina (Kaunas, Lithuania), 48(6): 305-309.
- Nourbakhsh, F. and Momtaz, H. (2016). Evaluation of Phenotypic and Genotypic biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates, isolated from Hospital infections in Shahrekord, 2015. Arak Medical University Journal, 19(109): 69-79. [In Persian]
- Markey, B.K., Leonard, F.C., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. (2013). Clinical Veterinary Microbiology. 2ed., Dublin: Mosby-Elsevier Ltd, pp: 445-453, 735-755.
- Mirzaee, M., Najar-Peerayeh, S. and Ghasemian, A.M. (2014). Detection of icaABCD genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Iranian Journal of Pathology, 9(4): 257-262.
- Mirzaee, M., Najar-Peerayeh, S., Behmanesh, M., Forouzandeh-Moghadam, M. and Ghasemian, A.M. (2014). Biofilm formation and presence of ica genes in Staphylococcus aureus isolated from Intensive Care Unit. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 24(115): 43-51. [In Persian]

- Mirzaei, H., Javadi, A., Farajli, M., Shah-Mohammadi, A.R., Monadi, A.R. and Barzegar, A. (2012). Prevalence of Staphylococcus aureus resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. Journal of Veterinary Research, 67(1): 65-70. [In Persian]
- Moori-Bakhtiari, N. and Moslemi, M. (2017). Phenotypic evaluation of biofilm producing ability in Methicillin resistant Staphylococcus aureus. Journal of Kashan University of Medical Sciences (Feyz), 20(6): 525-231. [In Persian]
- Peymani, A., Farajnia, S., Nahaei, M.R., Sohrabi, N., Abbasi, L., Ansarin, K., et al. (2012). Prevalence of Class 1 Integron among Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii in Tabriz, Northwest of Iran. Polish Journal of Microbiology, 61(1): 57-60.
- Phuektes, P., Mansell, P. and Browning, G. (2001). Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus and Streptococcal causes of bovine mastitis. Journal of Dairy Science, 84(5): 1140-1148.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. and Hartigan, P.J. (2011).Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Second ed., Dublin: Wiley-Blackwell Ltd, pp: 837-849.
- Shahkarami, F. and Rashki, S. (2016). Prevalence of ica operon related genes in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis clinical isolates. Iran Journal of Medical Microbiology, 9(4): 16-23. [in Persian]
- Solati, S.M., Tajbakhsh, E., Khamesipour, F. and Gugnani H.C. (2015). Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of Staphylococcus epidermidis isolated from clinical samples in Iran. AMB Express, 5(47): 1-5.
- Stevens, N.T., Tharmabala, M., Dillane, T., Greene, C.M., O'Gara, J.P. and Humphreys, H. (2008). Biofilm and the role of the ica operon and aap in Staphylococcus epidermidis isolates causing neurosurgical meningitis. Clinical Microbiology and Infection, 14(7): 719-722.
- Suzuki, T., Kawamura, Y., Uno, T., Ohashi, Y. and Ezaki, T. (2005). Prevalence of Staphylococcus epidermidis strains with biofilm-forming ability in isolates from conjunctiva and facial skin. American Journal of Ophthalmology,140(5): 844-850
- Vasudevan, P., Mohan-Nair, M.K., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus - aureus for biofilm formation.Veterinary Microbiology, 92(1): 179-85.
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. (2010). A microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. New Microbiology, 33(2): 137-145.