

Evaluation of the isolation rate of *Staphylococcus aureus* from the milk of cows suffering from different forms of mastitis in Khuzestan province and investigation of the prevalence of the *mecA* gene and methicillin resistance in the isolates

Asadi, H.¹, Gharibi, D.^{2*}, Moori Bakhtiari, N.³, Makki, M.⁴

1- PhD Student in Veterinary Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author's email: dr.gharibi@gmail.com

(Received: 2024/11/17 Accepted: 2025/2/12)

Expanded Abstract

Background and Objective: *Staphylococcus aureus* is one of the most prevalent and significant causative agents of mastitis in dairy cattle, commonly associated with clinical, subclinical, and chronic forms of the disease. This pathogen produces various enzymes and toxins that inflict severe and irreversible damage to mammary gland tissue, leading to a substantial reduction in milk yield, high treatment costs, and ultimately, culling of affected animals from the herd. From a public health perspective, *S. aureus* is also recognized as a zoonotic agent capable of causing skin and soft tissue infections, as well as food poisoning in humans. In recent years, the emergence and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains have raised serious concerns in both veterinary medicine and public health. This resistance is primarily attributed to the presence of the *mecA* gene located on the mobile genetic element SCCmec, which encodes the altered penicillin-binding protein PBP2a, conferring reduced susceptibility to all beta-lactam antibiotics. Given the widespread prevalence of mastitis in Iran and the significance of Khuzestan Province as one of the country's major dairy production hubs, this study was conducted to investigate the frequency of *Staphylococcus aureus* in milk samples from cows affected with various forms of mastitis in this region, to determine the prevalence of the *mecA* gene among confirmed isolates, and to evaluate their antimicrobial resistance profiles.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 300 milk samples were collected from dairy farms in the counties of Behbahan, Qaleh Tall, Ahvaz, Bagh-e Malek, and from referred cases to the Veterinary Teaching Hospital of Ahvaz Faculty of Veterinary Medicine during the

Iranian calendar years 1401–1402 (2022–2024). Clinical mastitis was diagnosed based on visible abnormalities in milk and udder tissues, while subclinical mastitis was identified using the California Mastitis Test (CMT). Sampling was performed under strict aseptic conditions and according to standard protocols, and samples were promptly transported to the laboratory. Initial bacterial isolation was carried out by culturing on blood agar, mannitol salt agar, and Baird-Parker agar, followed by phenotypic characterization (Gram staining, colony morphology, and catalase and oxidase tests). Suspected *S. aureus* isolates were genetically confirmed using PCR targeting the species-specific *nuc* gene (thermonuclease). Subsequently, the prevalence of the *mecA* gene among confirmed isolates was assessed by PCR using specific primers. Concurrently, the antimicrobial resistance pattern of the isolates was evaluated by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar using standard antibiotic disks of penicillin, clindamycin, doxycycline, ceftiofur, and trimethoprim-sulfamethoxazole.

Findings: Among the 300 milk samples examined, 46 isolates (15.33%) were preliminarily identified as *Staphylococcus aureus* based on phenotypic characteristics. Of these, only 31 isolates (10.33%) were definitively confirmed as *S. aureus* by PCR detection of the *nuc* gene. Molecular analysis revealed that only 2 isolates (6.45%) harbored the *mecA* gene. However, in the phenotypic test using ceftiofur disks, these two isolates were classified as susceptible, indicating a discrepancy between genotypic and phenotypic findings. Antimicrobial susceptibility testing showed that all isolates (100%) were sensitive to penicillin. In contrast, 6.45% of the isolates exhibited resistance to both trimethoprim-sulfamethoxazole and doxycycline, while 3.22% demonstrated resistance to clindamycin. None of the isolates showed resistance to ceftiofur.

Conclusion: The findings of this study indicate that *Staphylococcus aureus* remains an important etiological agent of bovine mastitis in Khuzestan Province, although the prevalence of MRSA strains in this region is very low. The observed discordance between genotypic and phenotypic results regarding the *mecA* gene may be due to insufficient gene expression under laboratory conditions or prolonged storage of the isolates. Nevertheless, the presence of even a small number of *mecA*-carrying isolates serves as a serious warning regarding the potential for MRSA dissemination within the livestock population and its possible transmission to humans. Furthermore, the observed resistance to certain non-beta-lactam antibiotics underscores the necessity for stringent monitoring of antimicrobial usage and the implementation of antimicrobial resistance surveillance programs in dairy farms. Overall, the results of this research can contribute to the development of more precise herd-level hygiene strategies, more appropriate antibiotic selection, and enhanced infection control programs.

Keywords: bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, *mecA* gene, Khuzestan, PCR, antimicrobial resistance, MRSA.

Conflict of interest: None declared.



DOI: 10.71499/jvcp.2025.1187724

"مقاله پژوهشی"

ارزیابی میزان جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از شیر گاوهای مبتلا به انواع ورم‌پستان در استان خوزستان و بررسی شیوع ژن *mecA* و مقاومت به متی‌سیلین در جدایه‌ها

حمزه اسدی^۱، داریوش غریبی^{۲*}، نغمه موری بختیاری^۳، میثم مکی^۴

۱- دانشجوی دکترای تخصصی باکتری‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: dr.gharibi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۶)

چکیده مبسوط

زمینه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم‌پستان (ماستیت) در گاوهای شیری است که به‌طور گسترده‌ای با ورم‌پستان‌های بالینی، تحت‌بالینی و مزمن همراه می‌باشد. این پاتوژن با تولید آنزیم‌ها و توکسین‌هایی که به بافت پستان آسیب جدی و غیرقابل‌برگشت می‌رسانند، منجر به کاهش قابل‌توجه تولید شیر، هزینه‌های درمانی بالا و در نهایت حذف دام از گله می‌شود. از دیدگاه بهداشت عمومی نیز، این باکتری به‌عنوان یک عامل زئونوزیسی (بیماری مشترک انسان و حیوان) مطرح است، چرا که می‌تواند در انسان نیز عفونت‌های پوستی، بافت نرم و حتی مسمومیت غذایی ایجاد کند. در سال‌های اخیر، ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) نگرانی جدی در حوزه دامپزشکی و سلامت عمومی ایجاد کرده است. این مقاومت عمدتاً ناشی از حضور ژن *mecA* در عنصر ژنتیکی متحرک SCCmec است که باعث تولید پروتئین PBP2a و نیمه‌حساسیتی به تمام آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتا-لاکتام می‌شود. با توجه به شیوع گسترده ماستیت در ایران و اهمیت استان خوزستان به‌عنوان یکی از قطب‌های اصلی دامداری کشور، این مطالعه با هدف بررسی فراوانی *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به انواع ورم‌پستان در این استان، تعیین شیوع ژن *mecA* در جدایه‌های تأییدشده و ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، ۳۰۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به ورم‌پستان بالینی و تحت‌بالینی در فارم‌های گاو شیری شهرستان‌های بهبهان، قلعه‌تل، اهواز، باغ‌ملک و موارد ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز طی سال‌های ۱۴۰۱ تا ۱۴۰۲ جمع‌آوری گردید. تشخیص ورم‌پستان بالینی بر اساس علائم ظاهری شیر و پستان و تشخیص ورم‌پستان تحت‌بالینی با استفاده از

آزمون کالیفرنیا (CMT) انجام شد. نمونه‌برداری با رعایت اصول آسپتیک و تحت شرایط استاندارد انجام و نمونه‌ها به سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی اولیه باکتری‌ها با کشت روی محیط‌های بلاد آگار، مانیتول سالت آگار و برد پارکر آگار و بررسی خصوصیات فنوتیپی (رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی کلنی، آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز) انجام گرفت. جدایه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس/اورئوس* سپس با استفاده از روش PCR بر اساس حضور ژن اختصاصی *nuc* (ترمونوکلئاز) تأیید ژنتیکی شدند. سپس، شیوع ژن *mecA* در جدایه‌های تأییدشده نیز با PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بررسی شد. هم‌زمان، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار دیسک در محیط مولر هیتون آگار و با دیسک‌های استاندارد پنی‌سیلین، کلیندامایسین، داکسی‌سیلین، سفوکسیتین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول ارزیابی گردید.

یافته‌ها: از میان ۳۰۰ نمونه شیر مورد بررسی، ۴۶ جدایه (۱۵/۳۳٪) بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی به‌عنوان *استافیلوکوکوس/اورئوس* اولیه تشخیص داده شدند که از این تعداد، تنها ۳۱ جدایه (۱۰/۳۳٪) با PCR و بر اساس حضور ژن *nuc* به‌طور قطعی تأیید شدند. ارزیابی مولکولی نشان داد که تنها ۲ جدایه (۶/۴۵٪) دارای ژن *mecA* بودند. با این حال، در آزمون فنوتیپی با استفاده از دیسک سفوکسیتین، این دو جدایه به‌عنوان حساس طبقه‌بندی شدند که نشان‌دهنده عدم همخوانی بین یافته‌های ژنوتیپی و فنوتیپی است. بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نیز نشان داد که تمام جدایه‌ها (۱۰۰٪) نسبت به پنی‌سیلین حساس بودند. در مقابل، ۶/۴۵٪ از جدایه‌ها نسبت به تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول و داکسی‌سیلین مقاوم بودند و ۳/۲۲٪ نیز نسبت به کلیندامایسین مقاومت نشان دادند. هیچ‌یک از جدایه‌ها نسبت به سفوکسیتین مقاومت نداشتند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که *استافیلوکوکوس/اورئوس* همچنان یکی از عوامل مهم ورم‌پستان در گاوهایی شیری استان خوزستان محسوب می‌شود، هرچند شیوع سویه‌های MRSA در این منطقه بسیار پایین است. عدم همخوانی بین نتایج ژنوتیپی و فنوتیپی در مورد ژن *mecA* می‌تواند ناشی از بیان ناکافی ژن در شرایط آزمایشگاهی یا ذخیره‌سازی طولانی‌مدت جدایه‌ها باشد. با این وجود، حضور حتی تعداد اندکی از جدایه‌های حامل ژن *mecA* هشدار جدی در مورد امکان گسترش MRSA در جمعیت دامی و انتقال آن به انسان است. همچنین، مقاومت نسبی جدایه‌ها به برخی آنتی‌بیوتیک‌های غیر-بتا-لاکتام، لزوم نظارت دقیق بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اجرای برنامه‌های پایش مقاومت آنتی‌میکروبیال در گاوداری‌ها را برجسته می‌سازد. به‌طور کلی، نتایج این پژوهش می‌تواند در طراحی راهبردهای بهداشتی دقیق‌تر، انتخاب مناسب‌تر آنتی‌بیوتیک‌ها و توسعه برنامه‌های کنترل عفونت در سطح گله مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: ورم‌پستان گاو، *استافیلوکوکوس/اورئوس*، مقاومت به متی‌سیلین، ژن *mecA*، خوزستان، PCR، آنتی‌بیوتیک‌رسانی، MRSA.

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، با درگیرکردن حدود ۵-۷۰ درصد گاوها، غالب‌ترین پاتوژن گرم مثبت شناخته‌شده‌ای است که مسئول ایجاد ورم پستان بالینی، تحت بالینی و مزمن می‌باشد (Vasudevan et al., 2003; Zecconi et al., 2013; Dastmalchi Saei et al., 2020). البته میزان کشندگی باکتری فوق خیلی کم است و بیشتر منجر به ورم پستان مزمن می‌شود که ممکن است چندین ماه طول بکشد. با این حال، آنزیم‌های تجزیه‌کننده و سمومی تولید می‌کند که به بافت پستان آسیب برگشت‌ناپذیر می‌رساند و در نهایت، تولید شیر کاهش می‌یابد (Vasudevan et al., 2003; Gilbert et al., 2013). البته بهداشت بافت پستان و بهداشت شیردوشی (از آنجا که اصلی‌ترین راه انتقال استافیلوکوکوس اورئوس، کارتیبه آلوده است) و حفاظت گاوهای سالم از گاوهای آلوده، عفونت را تا حد زیادی کاهش می‌دهد (Rainard et al., 2018). بیماری ورم پستان در ایران اندمیک بوده و موارد بروز این بیماری نسبتاً بالا می‌باشد (Abera et al., 2010). در صورتی که بیماری فوق به موقع تشخیص داده نشود و ایجاد شرایط بهداشتی- درمانی مناسب و قرنطینه‌ای در مورد گاوهای مبتلا، به درستی انجام نشود، احتمال دارد که باکتری‌های مولد ورم پستان به سایر دام‌ها سرایت کرده و کل گله را آلوده کند که این امر می‌تواند باعث خسارت‌های جبران‌ناپذیر اقتصادی از قبیل هزینه‌های درمان گاوهای مبتلا، کاهش چشمگیر تولید شیر بخصوص در موارد ورم پستان تحت بالینی و نهایتاً حذف دام‌های مبتلا شود (Yarabbi et al., 2014). گذشته از ضررهای

اقتصادی، بحث سلامت عمومی و خطری که در انتقال بقایای آنتی‌بیوتیکی به انسان و ایجاد سویه‌های مقاوم و نیز تأثیر آن بر پروتکل‌های درمانی در استفاده از اثربخشی آنتی‌باکتریال‌های فعلی وجود دارد هم مطرح است (Cikman et al., 2019). لذا علی‌رغم این که استافیلوکوکوس اورئوس غالباً به عنوان یکی از عوامل ورم پستان در حیوانات شیری گزارش شده است (Aires-de-Sousa et al., 2007)، اما چون باعث ایجاد انواع عفونت‌های بالینی اکتسابی بیمارستانی در پوست، بافت نرم و مسمومیت در انسان نیز می‌شود (Tong et al., 20015; Srednik et al., 2019)، بنابراین باکتری مذکور به عنوان یکی از باکتری‌های بیماری‌زای خطرناک مشترک که هم حیوانات و هم انسان را تهدید می‌کند، در نظر گرفته می‌شود (Thammavongsa et al., 2015; Carfora et al., 2016; Li et al., 2017).

توانایی استافیلوکوکوس اورئوس در به اشتباه انداختن سیستم ایمنی میزبان، آن را به یکی از مقاوم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در تاریخ درمان آنتی‌بیوتیکی تبدیل کرده است (Hiramatsu et al., 2014) و در حال حاضر گسترش سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین این باکتری (Meticilline Resistance) به عنوان یک نگرانی مهم برای سلامت حیوانات و انسان در سراسر جهان مطرح می‌باشد (García-Alvarez et al., 2011; Ba et al., 2014; van Rijen et al., 2014). توانایی مقاومت نسبت به متی‌سیلین در برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس عمدتاً توسط بیان ژن *mecA* که روی یک عنصر ژنتیکی متحرک به نام SCCmec (Staphylococcal

مواد و روش‌ها

در طی پژوهش حاضر، نمونه‌گیری از فارم‌های گاو شیری صنعتی شهرستان‌های بهبهان، قلعه تل، اهواز، باغ‌ملک و موارد ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز از اردیبهشت ۱۴۰۱ تا اردیبهشت ۱۴۰۲ به صورت مقطعی از گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان بالینی و تحت بالینی و تا حصول حداقل ۱۰۰ نمونه مثبت ورم‌پستان انجام گرفت. بدین منظور نمونه شیر از گاوهایی که واجد تغییرات غیرطبیعی در شیر مانند تغییر رنگ، وجود لخته و نیز تورم، گرمی، درد و قرمزی حداقل در یکی از چهار کارتیه پستان بودند، به عنوان گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان بالینی و نیز گاوهایی که فاقد علایم بالینی بوده ولی با استفاده از آزمون ورم‌پستان کالیفرنیا (California Mastitis Test) نمونه شیر آن‌ها مثبت شده بود، به عنوان گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان تحت بالینی، اخذ شد. جهت نمونه‌برداری، ابتدا بافت پستان هر دام با آب شسته شده و سپس با حوله تمیز با دقت خشک شد، سپس سرپستانک (Teat) کارتیه‌ها با سواب آغشته به الکل اتیلیک ۷۰ درصد (غدير، ایران) به طور کامل ضدعفونی گردید. در ادامه دوشش اولیه شیر هر کارتیه دور ریخته شد و سپس ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر شیر اخذ شده و در یک لوله فالكون (Falcon Tube) استریل جمع‌آوری گردید. نمونه‌های شیر در کنار یخ نگهداری شده و بلافاصله تحت شرایط آسپتیک به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شد (Abed et al, 2021). نمونه‌های شیر بلافاصله در دستگاه سانتریفیوژ (اپندورف، آلمان) با سرعت ۳۰۰۰ دور دقیقه به

mec (Cassette Chromosome) قرار دارد ایجاد می‌شود. بیان ژن مذکور منجر به تولید یک پروتئین تغییر یافته پیوندشونده به پنی‌سیلین بنام PBP2a (Penicillin Binding Protein 2a) در باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* می‌شود که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام حساسیت بسیار کمی دارد و لذا این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم می‌شود (Hiramatsu et al., 2001; Abed et al, 2021; Kamroodi et al, 2022).

باتوجه به این‌که مطالعات ژنتیکی در مورد جدایه‌های حاصله از ورم‌پستان بالینی و تحت بالینی در اثر درگیری با باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* در ایران و به خصوص استان خوزستان انجام شده با این حال توصیه می‌شود مطالعات جامع تری در این خصوص صورت گیرد. از طرف دیگر باید توجه داشت که تاکنون واکسن مؤثری بر ضد بیماری ورم‌پستان در کشور ایران در دسترس نیست (Kerrou and vidlund., 2024) و لذا بهترین راه مقابله با آن، پیشگیری و در صورت بروز ورم‌پستان، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌باشد.

با توجه به اهمیت مطالب ارائه شده، مطالعه حاضر به منظور بررسی حضور *استافیلوکوکوس/اورئوس* در نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از گاوه‌های مبتلا به ورم‌پستان بالینی و تحت بالینی استان خوزستان و همچنین تعیین فراوانی حضور ژن *mecA* و ارزیابی الگوی حساسیت و یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *استافیلوکوکوس/اورئوس* انجام گردید.

مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و سپس مایع رویی حاصله دور ریخته شد. در ادامه یک لوپ پر از رسوب شیر بر روی پلیت‌های حاوی محیط‌های بلاد آگار (های مدیا، هند) با ۱۰ درصد خون دفیبرینه گوسفند، مانیتول سالت آگار (های مدیا، هند) و برد پارکر آگار (لیوفیلیجم، ایتالیا)، جداگانه کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. تشخیص اولیه جدایه‌های مربوط به باکتری /استافیلوکوکوس /اورئوس بر اساس ارزیابی خصوصیات فنوتیپی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، شکل باکتری، مورفولوژی کلنی‌ها، آزمون‌های اکسیداز و کاتالاز و نیز خصوصیات بیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام گرفت (Markey et al, 2013; Abed et al, 2021).

جدایه‌ها پس از تشخیص اولیه مطابق پروتکل ذکر شده، در داخل میکروتیوب‌های حاوی محیط اسکیم میلک (لیوفیلیجم، ایتالیا) و در دمای ۷۰- سلسیوس فریزر (GFL، آلمان) نگهداری شدند.

-ارزیابی ژنوتیپی جدایه‌های تحقیق:

در ادامه و به منظور تشخیص قطعی هویت جدایه‌ها، ابتدا آزمایش PCR بر اساس تکثیر ژن ترمونوکلاز

(*nuc*) و به کمک جفت پرایمرهای اختصاصی آن انجام گردید (Sasaki et al, 2010; El-Tawab et al, 2016). همچنین در ادامه جهت ردیابی ژن *mecA* در جدایه‌ها، آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوطه و مطابق با روش توصیف شده توسط شوئنک و همکاران انجام شد (Schuenck et al., 2006). مشخصات کامل پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های *nuc* و *mecA*، در جدول ۱ ارائه شده است.

لازم به ذکر است که در این مرحله، ابتدا DNA تمام جدایه‌های مشکوک به /استافیلوکوکوس /اورئوس بودن بر مبنای یافته‌های فنوتیپی، با استفاده از روش جوشاندن، استخراج گردید (Öztürk et al., 2019; Amini Kamroodi et al., 2022) و سپس مراحل اصلی واکنش‌های PCR مورد نظر، مطابق اطلاعات ارائه شده در جدول ۲، انجام گردید. همچنین به منظور کنترل کیفیت، همه مراحل استخراج DNA در مورد سوش استاندارد باکتری /استافیلوکوکوس /اورئوس (ATCC-33591) به عنوان کنترل مثبت هم انجام گردید.

جدول ۱- مشخصات توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

ژن هدف	توالی پرایمرها (5'→3')	اندازه محصول (bp)
<i>nuc</i>	F: TCGCTTGCTATGATTGTGG R: GCCAATGTTCTACCATAGC	۲۸۰
<i>mecA</i>	F: TAGAAATGACTGAACGTCGG R: TTGCGATCAATGTTACCGTAG	۳۰۷

پیشگام، ایران) مربوط به ژن‌های هدف (جدول ۱)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس آماده (شرکت امپلیکون، دانمارک) و ۴ میکرولیتر از DNA

برای انجام واکنش‌های PCR مورد نظر (جدول ۲)، در هر میکروتیوب، مقدار ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس (شرکت

استخراجی هر جدایه اضافه شد و سپس با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. در ادامه میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) قرار داده شدند.

جدول ۲- مشخصات زمان و دمای سیکل‌های واکنش‌های PCR جهت تکثیر ژن‌های *nuc* و *mecA*

ژن	سیکل‌ها	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل‌ها
<i>nuc</i>	سیکل اول	۹۴	۵ دقیقه	۱
	سیکل دوم	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		۵۵	۳۰ ثانیه	
		۷۲	۳۰ ثانیه	
	سیکل سوم	۷۲	۱۰ دقیقه	۱
<i>mecA</i>	سیکل اول	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
	سیکل دوم	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
		۵۶	۳۰ ثانیه	
		۷۲	۳۰ ثانیه	
	سیکل سوم	۷۲	۵ دقیقه	۱

پس از اتمام واکنش‌های PCR، جهت مشاهده باندهای تولید شده در اثر تکثیر هر یک از ژن‌های مورد نظر تحقیق، با استفاده از مقدار ۸ میکرولیتر از هر یک از محصولات حاصله و ژل آگاروز (سیناکلون، ایران)، به همراه ۲ میکرولیتر رنگ ایمن (Safe Stain) (سیناکلون، ایران) عمل الکتروفورز (پایاپژوهش، ایران) انجام شد و در نهایت هم از باندهای حاصله با استفاده از اشعه UV دستگاه ایلومیناتور (یوویتک، انگلستان)، عکس‌برداری گردید.

– ارزیابی فنوتیپی مقاومت به متی‌سیلین و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های تحقیق:

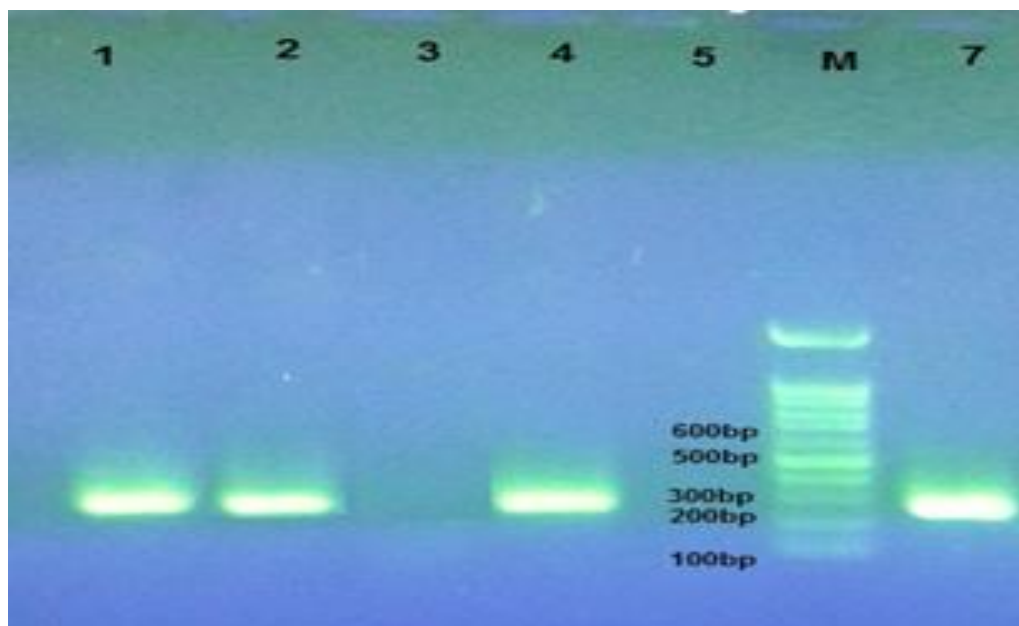
در پژوهش حاضر با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار، تعیین فنوتیپی مقاومت به متی‌سیلین و سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها هم انجام

گرفت. بدین منظور از کشت ۲۴-۱۸ ساعته هر یک از جدایه‌های *استافیلوکوکوس/اورئوس* که در بخش ژنوتیپی تحقیق و بر اساس ارزیابی تکثیر ژن *nuc* تأیید شده بودند، سوسپانسیونی مطابق با کدورت ۰/۵ استاندارد مک فارلند (McFarland) تهیه کرده و با استفاده از سوآپ استریل در سطح محیط مولر هیتون آگار (مرک، آلمان)، به صورت پخش کردن یکنواخت، کشت داده شد. سپس دیسک‌های استاندارد (پادتن طب، ایران) آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰ U/disk)، داکسی‌سیلین (۱۰ μg/disk)، سفوکسیتین (۳۰ μg/disk)، تری متوپریم سولفامتوکسازول (۲۵ μg/disk) و کلیندامایسین (۲ μg/disk) بر روی محیط مذکور با رعایت فاصله استاندارد قرار داده شد. در ادامه همه محیط‌های کشت

یافته‌ها

در قسمت فنوتیپی تحقیق حاضر، تعداد ۴۶ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۵/۳۳ درصد) از ۳۰۰ نمونه شیر اخذ شده، شناسایی شد. از طرف دیگر از تعداد ۴۶ جدایه واجد خصوصیات اولیه *استافیلوکوکوس اورئوس* در مرحله تشخیص فنوتیپی پژوهش، تعداد ۳۱ جدایه در واکنش زنجیره‌ای پلی-مرارز، براساس ردیابی ژن *nuc* به‌عنوان باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱).

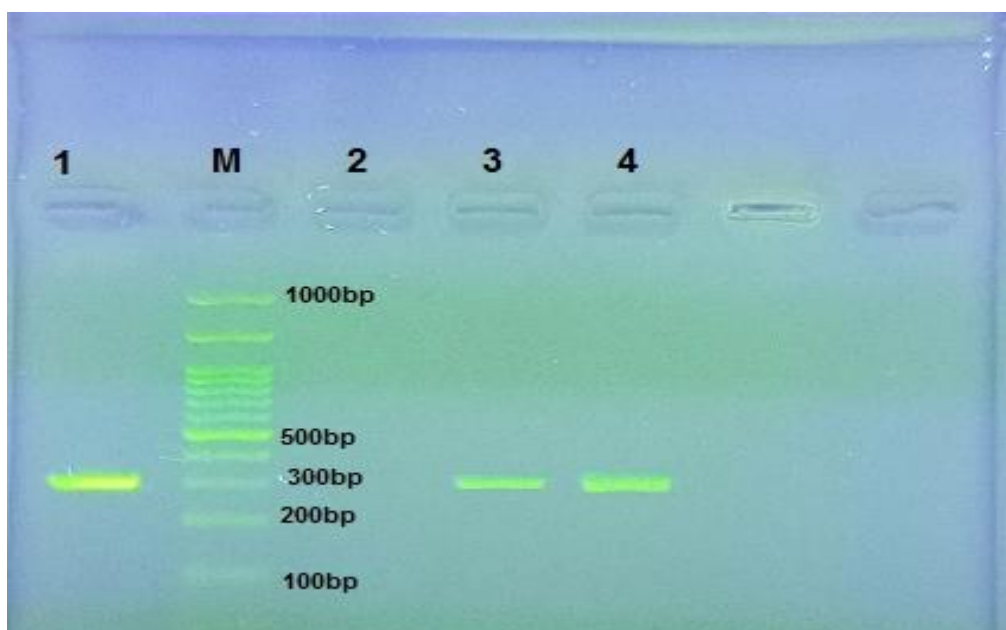
مذکور، به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، قطر منطقه عدم رشد ایجاد شده در اطراف هر یک از دیسک‌ها را با خط کش مدرج دقیق اندازه‌گیری کرده و نتایج قرائت شده با استفاده از جدول استاندارد به‌صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید. لازم به ذکر است که سنجش مقاومت فنوتیپی نسبت به متی‌سیلین هم مطابق روش فوق و با استفاده از دیسک سفوکسیتین ($30 \mu\text{g}/\text{disk}$)، انجام شد (CLSI, 2021).



شکل ۱- نتیجه الکتروفورز ژل آگاروز مربوط به محصولات PCR انجام‌شده برای تکثیر ژن *nuc* چاهک (M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سینا کلون، ایران)، چاهک (۷) نمونه کنترل مثبت حاوی باندی به اندازه ۲۸۰ جفت باز، چاهک (۵) کنترل منفی، چاهک‌های ۱، ۲ و ۴) جدایه‌های واجد ژن *nuc* چاهک (۳) جدایه منفی فاقد ژن (جدایه‌ای که واجد ژن *nuc* نبوده و به عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید نشد).

استافیلوکوکوس اورئوس، فقط ۲ جدایه (۶/۴۵ درصد) واجد ژن *mecA* بودند (شکل ۲).

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که از مجموع ۳۱ جدایه تأیید شده به عنوان باکتری

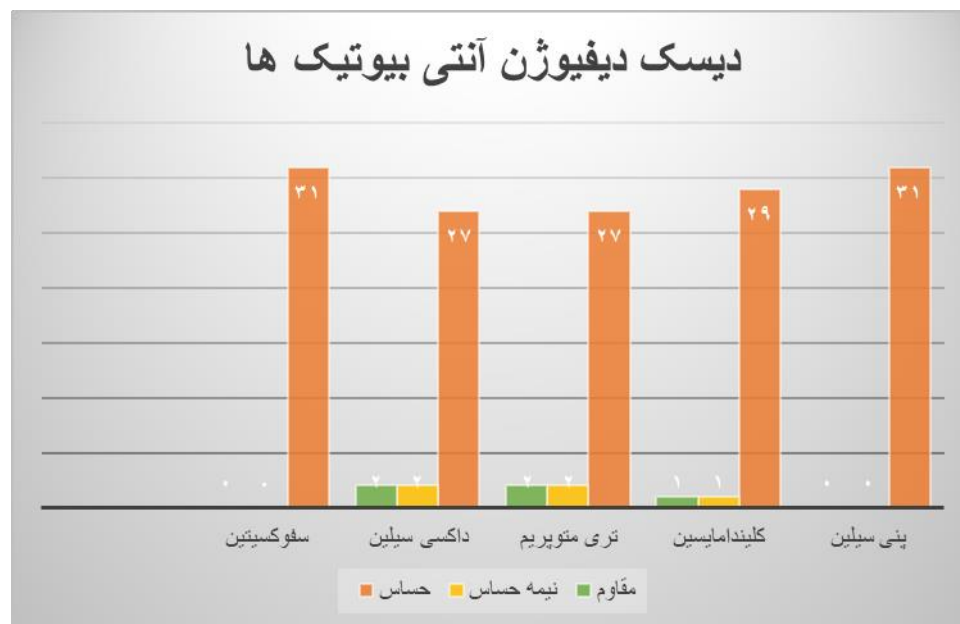


شکل ۲- نتیجه الکتروفورز ژل آگاروز مربوط به محصول PCR انجام شده برای تکثیر ژن *mecA* (چاهک M) سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران)، چاهک ۱) نمونه کنترل مثبت حاوی بانندی به اندازه ۳۰۷ جفت باز، چاهک ۲) کنترل منفی، چاهک‌های ۳ و ۴) جدایه‌های واجد ژن *mecA*.

درصد) نیز نسبت به کلیندامایسین حساسیت نسبی داشتند (نمودار ۱).

همچنین هیچ‌یک از جدایه‌ها در برابر سفوکستین مقاوم نبوده و حساسیت نشان دادند. لازم به ذکر است که در تحقیق حاضر مطابق توضیح در قسمت مواد و روش‌ها، برای سنجش مقاومت فنوتیپی نسبت به متی‌سیلین از دیسک استاندارد آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین استفاده کردیم (نمودار ۱).

از ۳۱ جدایه تأیید شده به عنوان باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* همگی (۱۰۰ درصد) نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین حساس بودند. همچنین ۱ جدایه (۳/۲۲ درصد) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلیندامایسین و ۲ جدایه (۶/۴۵ درصد) نسبت به تری متوپریم-سولفامتوکسازول و داکسی سیلین مقاوم بودند. ضمناً جدایه ۲ (۶/۴۵ درصد) هم نسبت به داکسی سیلین و ۱ جدایه (۳/۲۲ درصد)



نمودار ۱- نتایج بررسی الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

در طی پژوهش حاضر، که به صورت مقطعی از گاوهای مشکوک به ورم پستان بالینی و تحت‌بالینی فارم‌های صنعتی گاو شیری شهرستان‌های بهبهان، قلعه تل، اهواز، باغ ملک و موارد ارجاعی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی اهواز انجام گرفت، از تعداد ۳۰۰ نمونه شیر، تعداد ۴۶ جدایه (۱۵/۳۳ درصد)، *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از کشت در محیط‌های اختصاصی ذکر شده در مطالعه حاضر و بر اساس ارزیابی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی تشخیص اولیه داده شد، که از ۴۶ جدایه واجد خصوصیات اولیه *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳۱ جدایه (۱۰/۳۳ درصد) در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، براساس ردیابی ژن *nuc* به عنوان باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). از طرف دیگر در مطالعه حاضر از تعداد

۳۱ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* تأیید نهایی شده، فقط در ۲ جدایه (۶/۴۵ درصد) با روش PCR، حضور ژن *mecA* (ژن مقاومت به متی‌سیلین) مشاهده گردید (شکل ۲)، این در حالی است که در آزمون فنوتیپی، ۲ جدایه مذکور، حساس به سفوکسیتین بودند (نمودار ۱). عدم همخوانی نتایج آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در تحقیق حاضر، با نتایج حاصله از مطالعه خوبی و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Khoei et al., 2014) و یافته‌های امینی کمرودی و همکاران در سال ۱۴۰۱ (Amini Kamroodi et al., 2022) مشابهت دارد. در این ارتباط به نظر می‌رسد که عدم تطابق مذکور می‌تواند به علت وجود سویه‌های هتروژنوس و یا نگهداری و فریز کردن طولانی مدت جدایه‌ها باشد که باعث شده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، توان بیان ژن *mecA* را در شرایط آزمایشگاهی از دست بدهد

عامل ورم پستان، ۴۴/۹ درصد گزارش شده است (Abed et al., 2021). همچنین در مطالعه قربانپور و همکاران در اهواز، از تعداد ۱۰۰ نمونه شیر مربوط به ورم پستان گاوی، ۲۵ جدایه (۲۵ درصد) به روش مولکولی، به عنوان استافیلوکوکوس/اورئوس، تأیید شده است (Ghorbanpour et al., 2007). در مطالعه آبرا و همکاران در سال ۲۰۱۰ در اتیوپی هم از تعداد ۳۰ نمونه شیر مربوط به ورم پستان بالینی، ۱۰ جدایه (۳۳/۳ درصد) و از تعداد ۱۱۰ نمونه شیر مربوط به ورم پستان تحت بالینی، ۴۹ جدایه (۴۴/۵ درصد) به عنوان استافیلوکوکوس/اورئوس، شناسائی شده است (Abera et al., 2010). از طرف دیگر در مطالعه فوئکتز و همکاران، ۱۱۷ نمونه شیر مرتبط با عفونت تحت بالینی ورم پستان در استرالیا بررسی شده و فقط تعداد ۷ جدایه (۵/۹۹ درصد) به عنوان استافیلوکوکوس/اورئوس شناسائی شده است (Phuektes et al., 2001). همچنین طبق گزارش اطمیابی و همکاران در سال ۲۰۰۵، شیوع استافیلوکوکوس/اورئوس در موارد ورم پستان گاوی در ایران پایین تر بوده است، به طوری که از تعداد ۲۹۰۴ نمونه شیر جمع آوری شده، تنها ۸۴ جدایه استافیلوکوکوس/اورئوس (۲/۸۹ درصد) شناسائی شده است (Atyabi et al., 2005). به نظر می رسد که عدم تشابه نتایج پژوهش های ذکر شده، با یافته های تحقیق حاضر، ممکن است ناشی از تفاوت های مدیریتی، سطح رعایت بهداشت و سیستم های شیردوشی باشد (Amini Kamroodi et al., 2022). اما همان طور که قبلاً اشاره شد، از ۳۱ جدایه باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس تأیید شده فنوتیپی و ژنوتیپی، در ۲ جدایه (۶/۴۵ درصد) با روش PCR

(Amini Kamroodi et al., 2022)، که این امر می تواند به عنوان یک مسئله در شناسایی دقیق سویه های MRSA و یک چالش مطرح باشد (Amini Kamroodi et al., 2022).

در مطالعه ای که توسط هوایی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در اصفهان انجام شده، از تعداد ۴۵۰ نمونه شیر جمع آوری شده نیز، ۵۴ جدایه (۱۲ درصد) از باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس شناسائی شده است (Havaei et al., 2014). همچنین در همخوانی نسبی با یافته های تحقیق حاضر، در مطالعه ابراهیمی و اخوان طاهری در سال ۲۰۰۹ در شهرکرد هم ۸ باکتری (۱۶/۸ درصد) به عنوان استافیلوکوکوس/اورئوس از تعداد ۹۸ نمونه شیر جدا شده است (Ebrahimi and Akhavan Taheri, 2009). نتایج پژوهش حاضر در مطالعه ناظر و سرمدی در شیراز نیز در تعداد ۱۳۵۲ نمونه شیر مربوط به موارد ورم پستان، ۱۱۸ جدایه (۸/۷۳ درصد) استافیلوکوکوس/اورئوس شناسائی شده است (Nazer and Sarmadi, 2005). همچنین بوساتو و همکاران مطالعه ای را در سال ۲۰۰۰ بر روی ۱۹۰۷ گاو شیری مبتلا به ورم پستان در کشور سوئیس انجام داده و میزان جداسازی باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس از نمونه های فوق را نزدیک به نتایج تحقیق حاضر، ۱/۷ درصد گزارش کرده اند (Busato et al., 2000). البته از طرفی هم نتایج فراوانی جداسازی باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس در پژوهش حاضر با برخی از نتایج مطالعات مشابه انجام شده در ایران و خارج مطابقت نداشت. به عنوان مثال در مطالعه ای که توسط عابد و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شده، فراوانی شیوع باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس به عنوان

منطقه نمونه‌گیری و استفاده از روش‌های مدیریتی مناسب در گاوداری‌های مناطق مورد مطالعه حاضر باشد (Amini Kamroodi et al., 2022).

البته با وجود این‌که در مطالعه حاضر هیچ‌یک از جدایه‌ها در آزمایش فنوتیپی مقاوم به متی‌سیلین گزارش نگردید (نمودار ۱)، در ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، مشخص شد که از تعداد ۳۱ جدایه /ستافیلوکوکوس/ورئوس، همه آن‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین حساس بودند (نمودار ۱). در مطالعات انجام‌شده توسط یوسف و همکاران در سال ۲۰۱۹ در شهر مشهد روی ۱۱۱ نمونه ۵۶ درصد (Youssif et al., 2019)، توسط آکو و همکاران در سال ۲۰۱۶ در شهر تهران روی ۴۵ نمونه ۸۷ درصد (Akkou et al., 2016)، توسط پور تقی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در شهر تهران روی ۴۴۴ نمونه ۱۰۰ درصد (Pourtaghi et al., 2016)، توسط صاحب خطیری و همکاران در سال ۲۰۱۶ در شهر البرز روی ۴۴۴ نمونه ۵۰ درصد (Sahebekhtari et al., 2016) /ستافیلوکوکوس/ورئوس جدا شده از ورم پستان تحت بالینی مقاوم به پنی‌سیلین گزارش گردید که میزان مقاومت گزارش‌شده در پژوهش حاضر کمتر از میزان گزارش‌شده در این پژوهش‌ها است. این امر ممکن است به علت استفاده وسیع از پماد داخل پستانی در گاوداری‌ها، استفاده از دوزهای پایین‌تر از مقدار لازم و یا عدم کامل کردن دوره‌ی درمان باشد (Amini Kamroodi et al., 2022). اما در مطالعه حاضر مشخص گردید که میزان مقاومت نسبت به تری متوپریم-سولفامتوکسازول (۶/۴۵ درصد)، کمتر از مقدار گزارش‌شده در پژوهش آمینی کمروودی و

حضور ژن *mecA* به تأیید رسید. در هم‌خوانی با یافته مذکور، یافته‌های آمینی کمروودی و همکاران در سال ۲۰۲۲ (Amini Kamroodi et al., 2022)، سنگری فر و همکاران در سال ۲۰۱۶ (Sangarifar et al., 2016) و سردنیک و همکاران در سال ۲۰۱۹ (Srednik et al., 2019) مطابقت دارد، همچنین یافته مذکور با نتایج بعضی از مطالعات انجام‌شده در ایران و خارج ایران مطابقت ندارد. به‌عنوان مثال در مطالعه هوایی و همکاران در سال ۲۰۱۴ که در شهر اهواز انجام شده، از تعداد ۵۴ /ستافیلوکوکوس-ورئوس/ جدا شده از شیر گاوه‌های مبتلا به ورم پستان، با روش انتشار دیسک در آگار، تعداد ۱۰ (۱۸/۵۲ درصد) ایزوله مقاوم به متی‌سیلین شناسایی شد (Havaei et al., 2014). همچنین در مطالعه‌ای که توسط عابد و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شده، فراوانی ژن *mecA* در جدایه‌های باکتری /ستافیلوکوکوس/ورئوس ۶۰ درصد گزارش شده است (Abed et al., 2021). در مطالعه تورک‌یلماز و همکاران نیز در ترکیه در سال ۲۰۱۰، از تعداد ۹۳ جدایه /ستافیلوکوکوس/ورئوس عامل ورم پستان گاوی، ۱۶ جدایه (۱۷/۲ درصد) به عنوان سویه MRSA شناسایی شده است (Turkyilmaz et al., 2010). همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط شریواستاوا و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شده، از تعداد ۸۵ جدایه /ستافیلوکوکوس/ورئوس به‌دست آمده از ورم پستان گاوی، در ۱۴ جدایه (۱۶/۴۷ درصد)، ژن *mecA* شناسایی گردیده است (Shrivastava et al., 2017). به نظر می‌رسد که علت عدم همخوانی‌های مشاهده شده، می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان جامعه آماری و

مدت دام آلوده‌های در گله باشد (Amini Kamroodi et al., 2022).

با توجه به این که در طی مطالعه حاضر مشاهده شد که استافیلوکوکوس/اورئوس‌های جدا شده از دام‌های مبتلا به ورم پستان، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتا لاکتام مقاومت نشان داده‌اند (نمودار ۱) (اگرچه درصد مقاومت گزارش شده بالا نبود)، این امر اهمیت استفاده محتاطانه از آنتی‌بیوتیک‌ها را در گاوداری‌ها را مشخص می‌نماید. اگرچه تحقیق بر روی جدایه‌های MRSA حاوی ژن *mecA* در استان خوزستان بسیار کم انجام شده، اما مشخص شد که خوشبختانه این سویه‌ها در منطقه خوزستان، شیوع بالایی ندارد. هرچند که لازم است پژوهش‌های بیشتری در این مورد انجام شود و البته حضور همین میزان کم از باکتری‌های مذکور، زنگ خطری در خصوص اشاعه بیشتر سویه‌های مذکور در جمعیت دامی و متعاقب آن انتقال به جمعیت انسانی می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد که کنترل و پایش مقامات‌های آنتی‌بیوتیکی و استفاده از نتایج این چنین مطالعاتی به ما کمک می‌کند تا با روش‌های مناسب‌تری از انتشار سویه‌های مقاوم پیشگیری شود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با کمک معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسیده و منابع مالی آن در قالب بودجه پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است. بدین وسیله نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر می‌نمایند.

همکاران (۲۳ درصد)، می‌باشد (Amini Kamroodi et al., 2022). همچنین در مطالعه یوسفی و همکاران ۵۰ درصد جدایه‌ها استافیلوکوکوس/اورئوس نسبت به کلیندامایسین و ۷۵ درصد جدایه‌ها استافیلوکوکوس/اورئوس، نسبت به داکسی سیلین مقاوم بودند (Youssif et al., 2021). همچنین در تحقیق هوایی و همکاران از ۵۴ جدایه استافیلوکوکوس/اورئوس، ۶۷/۲۹ درصد آن‌ها نسبت به کلیندامایسین مقاوم بودند (Havaei et al., 2014). در مطالعه صالحی و همکاران در آذربایجان شرقی نیز که بر روی ۳۹ جدایه باکتری استافیلوکوکوس/اورئوس جدا شده از شیر گاوهایی مبتلا به ورم پستان انجام شده، فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۹۱ درصد، کلیندامایسین ۸۷ درصد و سفوکسیتین ۵۱ درصد گزارش شده است (Salehi et al., 2021). همچنین در مطالعه شکوهی و همکاران که در شهر ماکو انجام شده، میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس/اورئوس نسبت به پنی‌سیلین ۸۸/۳۳ درصد و نسبت به کوتریموکسازول ۳۵ درصد بوده است (Shokohi et al., 2018). این در حالی است که در پژوهش حاضر (۳/۲۲ درصد) جدایه‌ها نسبت به کلیندامایسین و (۶/۴۵ درصد) جدایه‌ها هم نسبت به داکسی سیلین مقاومت داشتند (نمودار ۱). به نظر می‌رسد که بالا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پژوهش‌های مذکور، می‌تواند به علت استفاده بیش از حد و طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش، عدم انجام آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی و حضور طولانی

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

منابع

- Abed, A.H., Menshaw, A.M., Zeinhom, M.M., Hossain, D., Khalifa, E., Wareth, G., *et al.* (2021). Subclinical mastitis in selected bovine dairy herds in North Upper Egypt: Assessment of prevalence, causative bacterial pathogens, antimicrobial resistance and virulence-associated genes. *Microorganisms*, 9(6): 11-75.
- Abera, M., Demie, B., Aragaw, K., Regassa, F. and Regassa, A. (2010). Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 2(3): 29-34.
- Aires-de-Sousa, M., Correia, B. and de Lencastre, H. (2008). Changing patterns in frequency of recovery of five methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Portuguese hospitals: surveillance over a 16-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9): 2912-2917.
- Aklilu, E. and Chia, H.Y. (2020). First mec C and mec A positive livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (mecC MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia. *Microorganisms*, 8(2): 1-47.
- Amini Kamroodi, M., HashemiTabar, G., Askari Badouei, M., Khoramian, B. and Kalateh Rahmani, H. (2022). Investigation of the presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying different mec types in isolates causing bovine sub-clinical mastitis. *New Findings in Veterinary Microbiology*, 5(1): 1-12. [In Persian]
- Ba, X., Harrison, E.M., Edwards, G.F., Holden, M.T., Larsen, A.R., Petersen, A., *et al.* (2014). Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing but lack the mec gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6(9): 594-597.
- Busato, A., Trachsel, P., Schällibaum, M. and Blum, J.W. (2000). Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, 44(3-4): 205-220.
- Carfora, V., Giacinti, G., Sagrati, D., Marri, N., Giangolini, G., Alba, P., *et al.* (2016). Methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in dairy sheep and in-contact humans: An intra-farm study. *Journal of Dairy Science*, 9(9): 4251-4258.
- Chandran, A., AA, M. H., Varghese, S. and Sheeja, K. M. (2008). Prevalence of multiple drug resistant *Escherichia coli* serotypes in a tropical estuary, India. *Microbes and Environments*, 23(2): 153-158.
- Cikman, A., Aydin, M., Gulhan, B., Karakeçili, F., Kurtoglu, M.G., Yuksekkaya, S., *et al.* (2019). Absence of the mecC gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical samples: The first multi-centered study in Turkey. *Journal of Infection and Public Health*, 12(4): 528-533.
- CLSI, C.L.S.I. (2021). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Twenty-: Document M100-S28. Wayne, PA, USA: CLSI, 2021.
- Cockcroft, P.D. and Holmes, M.A. (2004). Evidence-based veterinary medicine 1. Why is it important and what skills are needed? *In Practice*, 26(1): 28-33.
- Dastmalchi Saei, H. and Panahi, M. (2020). Genotyping and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminants: Differences in the distribution of clonal types between cattle and small ruminants. *Archives of Microbiology*, 202(1): 115-125.

- Devriese, L.A. and Hommez, J. (1975). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Research in Veterinary Science*, 19(1): 23-27.
- Dweba, C.C., Zishiri, O.T. and El Zowalaty, M.E. (2019). Isolation and molecular identification of virulence, antimicrobial and heavy metal resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 8(2): 79-81.
- Ebrahimi, A. and Akhavan Taheri, M. (2009). Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(3): 273-277. [In Persian]
- El-Tawab, A., Ashraf, A., El Hofy, A.I., Amaar, A.M., Sleim, M.A.E.H. and Salem, H.S. (2016). Molecular characterization for some virulence and antibiotic resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cattle's subclinical mastitis in EL-Sharkia Governorate. *Benha Veterinary Medical Journal*, 30(1): 219-230.
- García-Álvarez, L., Holden, M.T., Lindsay, H., Brown, D.F., Webb, C.R., Curran, M.D., et al. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(8): 595-603.
- Gilbert, F. B., Cunha, P., Jensen, K., Glass, E. J., Foucras, G., Robert-Granié, C., et al. (2013). Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Veterinary Research*, 44(1): 1-23.
- Gomes, F. and Henriques, M. (2016). Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, 72(4): 377-382.
- Havaei, S.A., Nasr Esfahani, B., Hoseini, N. and Assadbeigi, B. (2014). Investigation of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of Methicillin-Resistant Strains (MRSA) in *Staphylococcus Aureus* Isolates Associated with Bovine Mastitis *Journal of Isfahan Medical School*, 32(298): 1319-1329. [In Persian]
- Hiramatsu, K., Cui, L.Z., Kuroda, M. and Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 9(10): 486-493. [In Persian]
- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., et al. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20(10): 593-601.
- Identification of bacteria isolated from dairy goats with subclinical mastitis and investigation of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 66(2): 191-196.
- Kerro Dego, O. and Vidlund, J. (2024). Staphylococcal mastitis in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1356259>.
- Khoei F., Mobaiyen, H., Nahaei, M.R. and Sedeghi Mohammadi, S. (2014). Antibiotic resistance pattern and Frequency of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from shohada hospital, Tabriz. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*, 2(3): 105-8. [In Persian]
- Li, T., Lu, H., Wang, X., Gao, Q., Dai, Y., Shang, J. and Li, M. (2017). Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis between 2014 and 2015. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7: 127.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A. and Maguire, D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. E-Book: *Clinical Veterinary Microbiology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 7(2): 105-120.
- Maskell, D.J. and Holmes, M.A. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine population in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(8): 595-603.
- Nazer, A.H.K. and 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 the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran*, 60(3): 247-252.
- Öztürk, D., Türitoğlu, H., Pehlivanoğlu, F. and Yapicier, Ö.Ş. (2019). Identification of bacteria isolated from dairy goats with subclinical mastitis and investigation of methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 66(2): 191-196.
 - Phuektes, P., Mansell, P.D. and Browning, G.F. (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.
 - Pourtaghi, H., Azizi, A.G. and Sodagari, H.R. (2016). Antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Alborz province, Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 19(2): 169-174.
 - Sahebkhietari, N., Nochi, Z., Eslampour, M., Dabiri, H., Bolfion, M., Taherikalani, M., et al. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58(2): 113-121. [In Persian]
 - Salehi, S., Anzabi, Y. and Ali, K.A. (2021). 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. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 15(59): fa253-fa269.
 - Sangarifar, S., Ghajavand, H., Johari, B. and Yari, A. (2017). Frequency of *clf-A*, *mec-A*, and *mec-C* Genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nosocomial infections and cow's milk. *Anatomical Sciences Journal*, 14(2): 91-96.
 - Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Sakusabe, A., Ohtsuka, M., Hirotaki, S., et al. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3): 765-776.
 - Schuenck, R.P., Lourenco, M.C., Iório, N.L., Ferreira, A.L., Nouér, S.A. and Santos, K.R. (2006). Improved and rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage using selective broth and multiplex PCR. *Research in Microbiology*, 157(10): 971-975.
 - Shokohi, M., Ahmadizadeh, C. and Kaveh, A. (2018). Evaluation of bacterial causes of subclinical mastitis in dairy cattle of Negine Sabze Makoo agro-industrial and animal husbandry complex. *Veterinary Clinical Pathology*, 11(4): 379-396. [In Persian]
 - Shome, B.R., Das Mitra, S., Bhuvana, M., Krithiga, N., Velu, D., Shome, R., et al. (2011). Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6): 1349-1356.
 - Shrivastava N, Sharma V, Nayak A, Shrivastava AB, Sarkhel BC, Shukla PC, et al. (2017). Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Mastitis in Dairy Cattle in Jabalpur, Madhya Pradesh. *Journal of Animal Research*, 7(1): 77-78.
 - Srednik, M.E., Crespi, E., Testorelli, M.F., Puigdevall, T., Pereyra, A.M.D., et al. (2019). First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. *Veterinary and Animal Science*, 7: 100043.
 - Thammavongsa, V., Kim, H.K., Missiakas, D. and Schneewind, O. (2015). Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature reviews. Microbiology*, 13(9): 529-543.
 - Türkyılmaz, S., Tekbıyık, S., Oryasin, E. and Bozdoğan, B. (2010). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses and Public Health*, 57(3): 197-203.
 - VanRijen, M.M., Bosch, T., Verkade, E.J., Schouls, L., Kluytmans, J.A. and CAM Study Group. (2014). Livestock-associated MRSA carriage in patients without direct contact with livestock. *PLoS One* 9, e100294.

- Vasudevan, P., Nair, M.K.M., Annamalai, T. and Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, 92(1-2): 179-185.
- Yarabbi, H., Mortazavi, A., Mehraban, M. and Sepehri, N. (2014). Effect of somatic cells on the physico-chemical and microbial properties of raw milk in different seasons. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4(3): 289-298. [In Persian]
- Youssif, N.H., Hafiz, N.M., Halawa, M.A. and Aziz, H.M. (2021). Genes conferring antimicrobial resistance in cattle with subclinical mastitis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 24(1): 55-56.