University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Research Article

Molecular Isolation of Coagulase-Negative Staphylococci From Milk of Cows With Mastitis in Dairy Farms in Karaj City, Iran, During 2023

Fateh Rahimi[1]✉, **Sanaz Khashei**[2]✉

[1] *Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran*

[2] *Graduated from the Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran*

Received: *8 Oct 2025*, ***Reciver in revised from:*** *26 Nov 2025*, ***Accepted:*** *7 Dec 2025*, ***Available online****: 18 Mar 2026*

10.22059/jvr.2025.394736.3506

J Vet Res, Volume 81, Number 1, 2026, 55-71

Abstract

BACKGROUND: Although coagulase-negative Staphylococci (CoNS) are among the predominant pathogens causing bovine mastitis, limited data are available on CoNS associated with infections in Iran.

OBJECTIVES: This study aimed to determine the prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence-associated genes among various CoNS species isolated from bovine milk samples in Karaj City, Iran, during 2023.

METHODS: Over 6 months, 318 milk samples were collected from 3 selected dairy in the suburb of Karaj, Iran. CoNS isolates were identified to the species level using biochemical tests and polymerase chain reaction (PCR). Antimicrobial susceptibility to 14 antibiotics was assessed, and the presence of the *mecA* and *mecC* genes was investigated in methicillin-resistant isolates. Additionally, the presence of virulence-associated genes, including enterotoxins (*sea–seq*), hemolysins (*hla*, *hlb*, and *hld*), *tsst*, and *pvl* was examined in all confirmed isolates.

RESULTS: A total of 125 CoNS isolates were recovered and classified into 7 species: *Staphylococcus epidermidis* (39%), *S. sciuri* (16%), *S. simulans* (11%), *S. warneri* (10%), *S. haemolyticus* (9%), *S. chromogenes* (8%), and *S. capitis* (7%). Methicillin resistance, associated with the *mecA* gene, was identified in 55% of the isolates. The highest antibiotic resistance rates were observed against penicillin (84%), erythromycin (79%), and ciprofloxacin (77%). The virulence genes *sea*, *sec*, *seg*, *seh*, *sek*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, *hla*, *hlb*, and *pvl* were detected in 36%, 10%, 17%, 4%, 34%, 10%, 8%, 6%, 3%, 36%, 10%, 13%, and 3% of the isolates, respectively.

CONCLUSIONS: The findings of this study highlight the significant role of CoNS species in bovine mastitis and underscore the need for effective infection control policies and the prudent use of appropriate antibiotics to successfully treat infections caused by CoNS.

Keywords: Antibiotic resistance, Bovine mastitis, Coagulase-negative staphylococci, Milk, Virulence factors

Copyright © The Author(s). Publisher: University of Tehran Press Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Fateh Rahimi, Tel/Fax: +98313-7932471 / +98313-7932456

How to cite this article:

Rahimi, F., Khashei, S. Molecular isolation of coagulase-negative staphylococci from milk of cows with mastitis in dairy farms in Karaj city, Iran, during 2023. Journal of Veterinary Research, 2026; 81(1): 55-71. doi: 10.22059/jvr.2025.394736.3506

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primer sequences and cycling conditions used for different PCR reactions.
Table 2. Frequency (%) of antibiotic resistance of methicillin-resistant and methicillin-sensitive coagulase-negative Staphylococci (CoNS) strains.
Table 3. Frequency (%) of antibiotic resistance of coagulase-negative Staphylococci (CoNS) strains.
Table 4. Frequency (%) of antibiotic resistance of methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci (CoNS) strains.
Table 5. Frequency of different virulence factor genes among different species of coagulase-negative Staphylococci (CoNS).
Figure 1. Distribution of different coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from contaminated milk samples.
Figure 2. Distribution of different coagulase-negative *Staphylococcus* species in milk samples among different dairy farms.
Figure 3. Distribution of different methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* species in milk samples among different dairy farms.
Figure 4. Distribution of different virulence factor genes among coagulase-negative *Staphylococcus* strains.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

جداسازی مولکولی استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی از نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان در دامداری‌های کرج، ایران در سال ۱۴۰۲

فاتح رحیمی[۱]، ساناز خاشعی[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] دانش آموخته دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶ مهر ۱۴۰۴، **تاریخ بازنگری:** ۵ آذر ۱۴۰۴، **تاریخ پذیرش:** ۱۶ آذر ۱۴۰۴، **تاریخ انتشار:** ۲۷ اسفند ۱۴۰۴

دوره ۸۱، شماره ۱، ۱۴۰۴، ۷۱-۵۵ 10.22059/jvr.2025.394736.3506

چکیده

زمینه مطالعه: گرچه استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی از جمله باکتری‌های بیماری‌زای غالب در ایجاد عفونت ورم پستان دام می‌باشند، اما اطلاعات محدودی درارتباط‌با عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها در ایران در دسترس می‌باشد.

هدف: مطالعه حاضر جهت تعیین فراوانی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های مربوط به عوامل حدت در میان گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی جداسازی‌شده از نمونه‌های شیر گاو، در شهر کرج در سال ۱۴۰۲ انجام گرفت.

روش‌کار: در مدت ۶ ماه ۳۱۸ نمونه شیر از سه دامداری منتخب جمع‌آوری و ایزوله‌های کواگولاز منفی با آزمون‌های بیوشیمیایی و polymerase chain reaction (PCR) تا حد گونه شناسایی شدند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به ۱۴ آنتی‌بیوتیک تعیین و حضور ژن‌های *mecA* و *mecC* در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین بررسی شد. حضور ژن‌های مربوط به عوامل حدت از قبیل انتروتوکسین‌ها (*sea-seq*)، همولیزین‌ها (*hla*، *hlb* و *hld*)، *tsst* و *pvl* در تمام سویه‌های تأییدشده سنجش شد.

نتایج: درمجموع ۱۲۵ جدایه *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی جداسازی شدند و درنهایت ۷ گونه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۳۹ درصد)، *استافیلوکوکوس سیوری* (۱۶ درصد)، *استافیلوکوکوس سیمولانس* (۱۱ درصد)، *استافیلوکوکوس وارنری* (۱۰ درصد)، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس* (۹ درصد)، *استافیلوکوکوس کروموژنز* (۸ درصد) و *استافیلوکوکوس کپیتیس* (۷ درصد) مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. همچنین، ۵۵ درصد سویه‌ها مقاوم به متی‌سیلین و واجد ژن *mecA* بودند. بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۸۴ درصد)، اریترومایسین (۷۹ درصد) و سیپروفلوکساسین (۷۷ درصد) مشاهده شد. ژن‌های *sea*، *sec*، *seg*، *seh*، *sek*، *sem*، *sen*، *seo*، *sep*، *seq*، *hla*، *hlb* و *pvl* به‌ترتیب در ۳۶، ۱۰، ۱۷، ۴، ۳۴، ۱۰، ۸، ۶، ۳، ۳۶، ۱۰، ۱۳ و ۳ درصد سویه‌ها شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده نقش مهم سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی در ایجاد بیماری ورم پستان دام‌ها و مؤید نیاز به اتخاذ سیاست‌های کنترل عفونت مناسب و استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر جهت درمان قطعی عفونت‌های ناشی از گونه‌های کواگولاز منفی می‌باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی، شیر، عوامل حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ورم پستان گاو

کپی‌رایت © نویسندگان. ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: فاتح رحیمی، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

بیماری ورم پستان گاو یکی از پرهزینه‌ترین و پیچیده‌ترین بیماری‌ها در صنایع لبنی محسوب می‌شود. پیچیدگی بیماری مرتبط با تعدد باکتری‌های بیماری‌زای عامل ایجاد بیماری، واکنش‌های فیزیولوژیکی متفاوت و مختلف نسبت به عوامل بیماری‌زا و همچنین تفاوت در تأثیر اقدامات پیشگیرانه و کنترلی برای ارگانیسم‌های مختلف می‌باشد (۱). سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) به‌عنوان بیماری‌زاهای اصلی در میان گاوهای شیرده شناخته می‌شوند که باعث کاهش قابل‌توجه تولید شیر و ایجاد خسارات جبران‌ناپذیر

در صنایع لبنی شده و به‌عنوان یک عامل ایجاد خطر برای سلامت عمومی جامعه محسوب می‌شوند (۲، ۳). اعضای این جنس براساس توانایی یا عدم توانایی آن‌ها در ایجاد لخته از پلاسمای سیتراته خرگوش، به دو دسته کواگولاز مثبت و کواگولاز منفی تقسیم‌بندی می‌شوند که به‌عنوان یک آزمون کلیدی تشخیصی مهم در میکروب‌شناسی بالینی شناخته می‌شود (۴). گونه‌های کواگولاز منفی جنس *استافیلوکوکوس* پیش‌تر ازنظر بیماری‌زایی چندان حائز اهمیت نبودند و تنها گزارشاتی از نقش آن‌ها در موارد تحت بالینی ورم پستان دام در اختیار بود.

با وجود این، شواهد متعددی نشان می‌دهند گونه‌های کواگولاز منفی *استافیلوکوکوس* (Coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS)) از عفونت‌های ورم پستان جداسازی شده‌اند و بنابراین به‌عنوان بیماری‌زاهای نوظهور جهت ایجاد عفونت‌های پستانی گاو در نظر گرفته می‌شوند (۱، ۵). شایع‌ترین گونه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی جداسازی‌شده از عفونت‌های داخلی پستان دام شامل *استافیلوکوکوس کروموژنز* (*Staphylococcus chromogens*)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*Staphylococcus epidermidis*)، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس* (*Staphylococcus haemolyticus*)، *استافیلوکوکوس سیوری* (*Staphylococcus sciuri*)، *استافیلوکوکوس سیمولانس* (*Staphylococcus simulans*)، *استافیلوکوکوس کوهنی* (*Staphylococcus cohnii*)، *استافیلوکوکوس زایلوزوز* (*Staphylococcus xylosus*)، *استافیلوکوکوس وارنری* (*Staphylococcus warneri*)، *استافیلوکوکوس کپتیس* (*Staphylococcus captis*) و *استافیلوکوکوس ایکوروم* (*Staphylococcus equorum*) می‌باشند (۵-۷). عوامل حدت مختلفی، مانند ژن‌های انتروتوکسینی (*sea-seq*)، ژن توکسین سندرم شوک سمی (Toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1))، عامل لخته (Clumping factor (CLF)) (clfA-clfD)، ژن چسبندگی بین‌سلولی و تشکیل بیوفیلم (*icaA-icaD*)، ژن توکسین همولیزین (*hla*، *hlb*، *hld* و *hlg*)، ژن لوکوسیدین پنتون ـ ولنتاین و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی (*mecA* و *mecC*) که در ابتدا در *استافیلوکوکوس اورئوس* شناسایی شدند، در حال حاضر در سویه‌های کواگولاز منفی *استافیلوکوکوس* نیز مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. این عوامل حدت مسئول کلونیزاسیون و ایجاد بیماری در غدد پستانی دام‌ها و همچنین ایجاد مسمومیت‌های غذایی می‌باشند (۵-۱۱).

از دیرباز گزارش‌های متعددی درمورد نقش *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان عامل بیماری‌زایی و ایجاد بیماری ورم پستان دام و ایجاد مسمومیت غذایی در اختیار بوده است (۱۲-۱۴)، بااین‌حال اطلاعات چندانی درمورد عوامل حدت گونه‌های مختلف کواگولاز منفی این جنس برای ایجاد عفونت پستان و مسمومیت غذایی در سطح جهانی منتشر نشده است (۵، ۶). در سال‌های اخیر عدم کفایت آزمون‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی دقیق گونه‌های کواگولاز منفی در عفونت‌های ورم پستان دام مشخص شده است؛ بنابراین استفاده از آزمون‌های مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی دقیق و سریع این گونه‌ها توصیه می‌شوند (۶، ۱۵). علاوه‌براین، در ایران نیز اطلاعات جامعی درمورد میزان شیوع و فراوانی گونه‌های مختلف کواگولاز منفی *استافیلوکوکوس* و همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، انواع عوامل حدت و انتشار کلونال این گونه‌ها در بالین و در میان دام‌ها وجود ندارد؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ژن‌های مربوط به عوامل حدت در میان گونه‌های مختلف استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی جداسازی‌شده از نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به بیماری ورم پستان در شهر کرج در سال ۱۴۰۲ انجام گرفت.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری، جمع‌آوری و شناسایی ایزوله‌های *استافیلوکوکوس*: در مطالعه حاضر که به‌صورت مقطعی انجام شد از خرداد لغایت آبان سال ۱۴۰۲ نمونه‌گیری از سه دامداری در حومه شهر کرج انجام گرفت. تمام دامداری‌های موردمطالعه از نوع نیمه‌صنعتی بوده و تحت نظارت مستمر دامپزشکی فعالیت داشتند. فرایند شیردوشی گاوها روزانه ۲ بار با دستگاه انجام شد. مدیریت بهداشتی در این مراکز شامل اجرای برنامه‌های منظم واکسیناسیون، پایش سلامت دام‌ها، رعایت اصول بهداشتی در فرایند شیردوشی و درمان موارد ابتلا به ورم پستان طبق پروتکل‌های استاندارد ملی صورت گرفت. ثبت داده‌های مرتبط با تولید شیر و وضعیت سلامت هر دام به‌صورت منظم انجام شد. تغذیه دام‌ها بر پایه کنسانتره و علوفه تازه بود. درمجموع ۳۱۸ گاو مبتلا به ورم پستان انتخاب شدند (دامداری ۱: ۱۴۴ گاو (۴۵ درصد)، دامداری ۲: ۹۵ گاو (۳۰ درصد) و دامداری ۳: ۷۹ گاو (۲۵ درصد)) و نمونه‌گیری از هر دام به‌صورت جداگانه توسط پرسنل هر دامداری انجام گرفت. انتخاب حیوانات براساس ویزیت دام توسط دامپزشک و وجود علائمی از قبیل التهاب در ناحیه پستان و همچنین بررسی نمونه شیر هر دام ازنظر وجود لخته یا تغییر رنگ شیر صورت گرفت. نمونه‌گیری با استفاده از بطری‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری درب

آبی استریل انجام شد و برای این منظور ابتدا سه مرتبه شیر از پستان دام خارج شد و سپس در مرتبه چهارم در حدود ۵۰ میلی‌لیتر نمونه شیر جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در کنار یخ و رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه ارسال شدند. در آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه اصفهان، در ابتدا نمونه‌های شیر بر روی محیط ژلوز مانیتول سالت (Merck, Darmstadt, Germany) کشت داده شدند و پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مدت، کلنی‌های سفید یا صورتی‌رنگ به‌عنوان ایزوله‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس* یا *میکروکوکوس* انتخاب شدند و پس از کشت و خالص‌سازی بر روی محیط ژلوز کلمبیا (Merck, Darmstadt, Germany) از آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز و همچنین رنگ‌آمیزی گرم جهت افتراق *استافیلوکوکوس* و *میکروکوکوس* از یکدیگر استفاده گردید (۴). درنهایت تمام ایزوله‌هایی که کوکسی گرم مثبت کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بودند جمع‌آوری شدند و با استفاده از آزمون کواگولاز به روش لوله (۴) ایزوله‌های کواگولاز منفی انتخاب شدند و در محیط مغذی واجد ۵۰ درصد گلیسرول در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. همچنین باتوجه‌به اینکه *استافیلوکوکوس سیوری* اکسیداز مثبت است، نحوه آرایش و اندازه کوکسی‌های گرم مثبت جهت افتراق دو جنس از یکدیگر از اهمیت بالاتری برخوردار بود. سپس از هر ایزوله کواگولاز منفی بر روی محیط‌های ژلوز خون‌دار (Scharlau, Spain) و ژلوز مانیتول سالت (Merck, Darmstadt, Germany) کشت داده شد و همچنین از آزمون‌های تولید آنزیم اوره آز و تخمیر قندهای مالتوز و سوکروز نیز جهت افتراق گونه‌های مختلف ایزوله‌های کواگولاز منفی *استافیلوکوکوس* استفاده شد (۴). پس از شناسایی گونه‌های مختلف با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، از آزمون polymerase chain reaction (PCR) و پرایمرهای اختصاصی جهت تأیید هر گونه استفاده شد.

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی: پس از شناسایی و تأیید هر سویه جداسازی‌شده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به روش انتشار دیسک و براساس دستورالعمل‌های clinical and laboratory standards institute (CLSI) تعیین گردید (۱۶). دیسک‌های مورداستفاده (Liofilchem, Italy) شامل اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول (۱/۲۵-۲۳/۷۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم)، کلیندامایسین (۲ میکروگرم)، لینزولاید (۳۰ میکروگرم)، مینوسایکلین (۱۵ میکروگرم) و نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم) بودند. همچنین برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به ونکومایسین از آزمون حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد آنتی‌بیوتیک و به روش broth microdilution و براساس استانداردهای CLSI استفاده شد (R ≥ 32 µg/mL, I = 8-16 µg/mL) (۱۶). علاوه‌براین سویه‌هایی که نسبت به حداقل ۳ آنتی‌بیوتیک از خانواده‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی مقاومت نشان دادند به‌عنوان سویه‌هایی با مقاومت چندگانه در نظر گرفته شدند.

جدول ۱. توالی پرایمرها و برنامه حرارتی مورداستفاده در آزمون‌های PCR.

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه	برنامه حرارتی
rdr (*S. epidermidis*)	F: 5′-AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG F: 5′-TCGATACCATCAAAAAGTTGG	۱۳۰	۹۴ °C: ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ °C: ۳۰ ثانیه، ۵۶ °C: ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C: ۴۵ ثانیه)، ۷۲ °C: ۵ دقیقه
sodA (*S. capitis*)	F: 5′-TCAGATATTCAAACTGCAGTACG F: 5′-CTACTTCACCTTTTTCTTCAGA	۱۰۳	۹۴ °C: ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ °C: ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C: ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C: ۴۵ ثانیه)، ۷۲ °C: ۵ دقیقه
sodA (*S. haemolyticus*)	F: 5′-CAAATTAAATTCTGCAGTTGAGG F: 5′-GGC TCTTATAGAGACCACATGTTA	۵۳۱	
sodA (*S. warneri*)	F: 5′-GTAACAAAATTAAATGCAGCTG F: 5′-TCTTACTGCAGTTTGAATATCAGA	۱۱۰	۹۴ °C: ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ °C: ۳۰ ثانیه، ۵۷ °C: ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C: ۴۵ ثانیه)، ۷۲ °C: ۵ دقیقه
gap (*S. sciuri*)	F: 5′-GATTCCGCGTAAACGGTAGAG F: 5′-CATCATTTAATACTTTAGCCATTGGA	۳۰۶	۹۴ °C: ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ °C: ۳۰ ثانیه، ۵۶ °C: ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C: ۴۵ ثانیه)، ۷۲ °C: ۵ دقیقه
gap (*S. simulans*)	F: 5′-AGCTTCGTTTACTTCTTCGATTGT F: 5′-AAAAGCACAAGCTCACATTGA C	۴۷۲	۹۴ °C: ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ °C: ۳۰ ثانیه، ۶۰ °C: ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C: ۴۵ ثانیه)، ۷۲ °C: ۵ دقیقه
sodA (*S. chromogenes*)	F: 5′-GCGTACCAGAAGATAAACAAACTC F: 5′-CATTATTTACAACGAGCCATGC	۲۲۲	۹۴ °C: ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴ °C: ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C: ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C: ۴۵ ثانیه)، ۷۲ °C: ۵ دقیقه
mecC	F: 5′-TGAACGAAGCAACAGTACACC R: 5′- AGATCTTTTCCGTTTTCAGCCT	۲۳۸	۹۵ °C: ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۵ °C: ۴۵ ثانیه، ۵۰ °C: ۴۵ ثانیه، ۷۲ °C: ۶۰ ثانیه)، ۷۲ °C: ۲ دقیقه
mecA	F: 5′-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R: 5′-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	۳۱۰	۹۴ °C: ۱۰ دقیقه، ۲۵ سیکل (۹۴ °C: ۴۵ ثانیه، ۵۵ °C: ۴۵ ثانیه، ۷۲ °C: ۱۰۵ ثانیه)، ۷۲ °C: ۸ دقیقه
sea	F: 5′-TAAGGAGGTGGTGCCTATGG		

	R: 5′-CATCGAAACCAGCCAAAGTT	۱۸۰	۹۴°C: ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴°C: ۴۵ ثانیه، ۶۲°C ۴۵ ثانیه، ۷۲°C: ۱۰۵ ثانیه)، ۷۲°C: ۱۰ دقیقه
seb	F: 5′-TCGCATCAAACTGACAAACG	۴۷۸	
	R: 5′-GCAGGTACTCTATAAGTGCC		
sec	F: 5′-ACCAGACCCTATGCCAGATG	۳۷۱	
	R: 5′-TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
sed	F: 5′-TCAATTCAAAAGAAATGGCTCA	۳۳۹	
	R: 5′-TTTTTCCGCGCTGTATTTTT		
see	F: 5′-TACCAATTAACTTGTGGATAGAC	۱۷۰	
	R: 5′-CTCTTTGCACCTTACCGC		
seg	F: 5′-CCACCTGTTGAAGGAAGAGG	۴۳۲	
	R: 5′-TGCAGAACCATCAAACTCGT		
seh	F: 5′-TCACATCATATGCGAAAGCAG	۴۶۳	
	R: 5′-TCGGACAATATTTTTCTGATCTTT		
sei	F: 5′-CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG	۵۲۹	
	R: 5′-CAGGCAGTCCATCTCCTGTA		
sej	F: 5′-GGTTTTCAATGTTCTGGTGGT	۳۰۶	
	R: 5′-AACCAACGGTTCTTTTGAGG		
sel	F: 5′-CACCAGAATCACACCGCTTA	۲۰۴	
	R: 5′-CTGTTTGATGCTTGCCATTG		
sek	F: 5′-ATGAATCTTATGATTTAATTTCAGAATCAA	۵۴۵	۹۵°C: ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل (۹۴°C: ۳۰ ثانیه، ۵۵°C: ۴۵ ثانیه، ۷۲°C: ۶۰ ثانیه)، ۷۲°C: ۱۰ دقیقه
	R: 5′-ATTTATATCGTTTCTTTATAAGAAATATCG		
sem	F: 5′-ATGAAAAGAATACTTATCATTGTTGTTTTATTG	۷۲۰	
	R: 5′-CTTCAACTTTCGTCCTTATAAGATATTTC		
sen	F: 5′-ATAAAAAATATTAAAAAGCTTATGAGATTGTTC	۷۷۷	
	R: 5′-ACTTAATCTTTATATAAAAATACATCAATATG		
seo	F: 5′- TATGTAGTGTAAACAATGCATATGCA	۷۸۵	
	R: 5′-TCTATTGTTTTATTATCATTATAAATTTGCAAAT		
sep	F: 5′-TTAGACAAACCTATTATCATAATGGAAGT	۶۱۸	
	R: 5′-TATATAAATATATATCAATATGCATATTTTTAGACT		
seq	F: 5′-GGAAAATACACTTTATATTCACAGTTTCA	۵۳۹	
	R: 5′-ATTTATTCAGTTTTCTCATATGAAATCTC		
tsst	F: 5′-ATGGCAGCATCAGCTTGATA	۳۵۰	۹۴°C: ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل (۹۴°C: ۳۰ ثانیه، ۵۵°C: ۲ دقیقه، ۷۲°C: ۶۰ ثانیه)، ۷۲°C: ۷ دقیقه
	R: 5′-TTTCCAATAACCACCCGTTT		
hla	F: 5′-GGTTTAGCCTGGCCTTC	۵۵۰	۹۵°C: ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۵°C: ۳۰ ثانیه، ۵۹°C: ۳۰ ثانیه، ۷۲°C: ۶۰ ثانیه)، ۷۲°C: ۸ دقیقه
	R: 5′-CATCACGAACTCGTTCG		
hlb	F: 5′-GCCAAAGCCGAATCTAAGAAAG	۴۹۵	۹۵°C: ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۵°C: ۳۰ ثانیه، ۵۵°C: ۳۰ ثانیه، ۷۲°C: ۶۰ ثانیه)، ۷۲°C: ۸ دقیقه
	R: 5′-ATCATGTCCAGCACCACAA		
hld	R: 5′-TGTGGATCCGTCATTCATTG	۹۳۷	۹۵°C: ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۵°C: ۳۰ ثانیه، ۵۳°C: ۳۰ ثانیه، ۷۲°C: ۶۰ ثانیه)، ۷۲°C: ۸ دقیقه
	F: 5′-CCAATCCGTTATTAGAAAATGC		
pvl	F: 5′-ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	۴۳۳	۹۴°C: ۱۰ دقیقه، ۱۰ سیکل (۹۴°C: ۴۵ ثانیه، ۵۵°C: ۴۵ ثانیه، ۷۲°C: ۷۵ ثانیه)، ۲۵ سیکل (۹۴°C: ۴۵ ثانیه، ۵۰°C: ۴۵ ثانیه، ۷۲°C: ۷۵ ثانیه)، ۷۲°C: ۱۰ دقیقه
	R: 5′-GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAGC		

جدول ۲. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مقاوم و حساس به متی‌سیلین.

آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)			*P* value
	مقاوم به متی‌سیلین	حساس به متی‌سیلین	تعداد کل	
اریترومایسین	۶۵(۹۴)	۳۴(۶۱)	۹۹(۷۹) ۹۹	< ۰/۰۰۰۱
پنی‌سیلین	۶۹(۱۰۰)	۳۶(۶۴)	۱۰۵(۸۴)	< ۰/۰۰۰۱
تتراسایکلین	۶۰(۸۷)	۲۹(۵۲)	۸۹(۷۱)	< ۰/۰۰۰۱
تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول	۵۵(۸۰)	۲۶(۴۶)	۸۱(۶۵)	< ۰/۰۰۰۱
جنتامایسین	۳۹(۵۷)	۲۱(۳۸)	۶۰(۴۸)	۰/۰۱۰۶
ریفامپین	۳۷(۵۴)	۱۲(۲۱)	۴۹(۳۹)	< ۰/۰۰۰۱
سیپروفلوکساسین	۶۵(۹۴)	۳۱(۵۵)	۹۶(۷۷)	< ۰/۰۰۰۱
کلرامفنیکل	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۱/۰۰۰۰
کلیندامایسین	۶۰(۸۷)	۱۶(۲۹)	۷۶(۶۱)	< ۰/۰۰۰۱
لینزولاید	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۱/۰۰۰۰
مینوسایکلین	۳۵(۵۱)	۱۹(۳۴)	۵۴(۴۳)	۰/۰۲۱۸
نیتروفورانتوئین	۳۰(۴۳)	۶(۱۱)	۳۶(۲۹)	< ۰/۰۰۰۱
ونکومایسین	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۱/۰۰۰۰

جدول ۳. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی.

آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)						تعداد کل
	گونه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی						
	I. کپیتیس	*I. کروموژنز*	*I. اپیدرمیدیس*	*I. همولیتیکوس*	*I. سیمولانس*	*I. سیوری*	*I. وارنری*	
اریترومایسین	۶(۶۷)	۶(۶۰)	۴۹(۱۰۰)	۷(۶۳)	۹(۶۴)	۱۴(۷۰)	۸(۶۷)	۹۹(۷۹)
پنی‌سیلین	۷(۷۸)	۸(۸۰)	۴۹(۱۰۰)	۷(۶۳)	۹(۶۴)	۱۶(۸۰)	۹(۷۵)	۱۰۵(۸۴)
تتراسایکلین	۵(۵۶)	۲(۲۰)	۴۷(۹۶)	۶(۵۵)	۷(۵۰)	۱۳(۶۵)	۹(۷۵)	۸۹(۷۱)
تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول	۴(۴۴)	۴(۴۰)	۴۶(۹۴)	۵(۴۵)	۴(۲۹)	۱۰(۵۰)	۸(۶۷)	۸۱(۶۵)
جنتامایسین	۳(۳۳)	۰(۰)	۴۰(۸۲)	۱(۹)	۰(۰)	۹(۴۵)	۷(۵۸)	۶۰(۴۸)
ریفامپین	۲(۲۲)	۱(۱۰)	۳۷(۷۶)	۱(۹)	۱(۷)	۴(۲۰)	۳(۲۵)	۴۹(۳۹)
سیپروفلوکساسین	۵(۵۶)	۶(۶۰)	۴۸(۹۸)	۷(۶۳)	۹(۶۴)	۱۳(۶۵)	۸(۶۷)	۹۶(۷۷)
کلرامفنیکل	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)
کلیندامایسین	۳(۳۳)	۲(۲۰)	۴۶(۹۴)	۴(۳۶)	۶(۴۳)	۹(۴۵)	۶(۵۰)	۷۶(۶۱)
لینزولاید	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)
مینوسایکلین	۰(۰)	۰(۰)	۳۸(۷۸)	۱(۹)	۱(۷)	۸(۴۰)	۶(۵۰)	۵۴(۴۳)
نیتروفورانتوئین	۰(۰)	۰(۰)	۳۰(۶۱)	۱(۹)	۲(۱۴)	۳(۱۵)	۰(۰)	۳۶(۲۹)
ونکومایسین	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)

جدول ۴. مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین.

آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)						تعداد کل
	گونه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی						
	I. کپیتیس	*I. کروموژنز*	*I. اپیدرمیدیس*	*I. همولیتیکوس*	*I. سیمولانس*	*I. سیوری*	*I. وارنری*	
اریترومایسین	۱(۵۰)	۲(۱۰۰)	۴۶(۱۰۰)	۲(۶۷)	۴(۸۰)	۷(۱۰۰)	۳(۷۵)	۶۶۵(۹۴)
پنی‌سیلین	۲(۱۰۰)	۲(۱۰۰)	۴۶(۱۰۰)	۳۲(۱۰۰)	۵(۱۰۰)	۷(۱۰۰)	۴(۱۰۰)	۶۹(۱۰۰)
تتراسایکلین	۱(۵۰)	۰(۰)	۴۴(۹۶)	(۶۷)	۴(۸۰)	۶(۸۶)	۳(۷۵)	۶۰(۸۷)
تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول	۱(۵۰)	۱(۵۰)	۴۴(۹۶)	۲(۶۷)	۲(۴۰)	۳(۴۳)	۲(۵۰)	۵۵(۸۰)
جنتامایسین	۱(۵۰)	۰(۰)	۳۳(۷۲)	۰(۰)	۰(۰)	۳(۱۵)	۲(۵۰)	۳۹(۵۷)
ریفامپین	۱(۵۰)	۱(۵۰)	۳۰(۶۵)	۱(۳۳)	۱(۲۰)	۲(۲۹)	۱(۲۵)	۳۷(۵۴)
سیپروفلوکساسین	۱(۵۰)	۱(۵۰)	۴۶(۱۰۰)	۲(۱۰۰)	۴(۸۰)	۷(۱۰۰)	۴(۱۰۰)	۶۵(۹۴)
کلرامفنیکل	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)
کلیندامایسین	۱(۵۰)	۱(۵۰)	۴۳(۹۳)	۲(۶۷)	۴(۸۰)	۶(۸۶)	۳(۷۵)	۶۰(۸۷)
لینزولاید	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)
مینوسایکلین	۰(۰)	۰(۰)	۲۹(۶۳)	۱(۳۳)	۱(۲۰)	۲(۲۹)	۲(۵۰)	۳۵(۵۱)
نیتروفورانتوئین	۰(۰)	۰(۰)	۲۵(۵۴)	۱(۳۳)	۲(۴۰)	۲(۲۹)	۰(۰)	۳۰(۴۳)
ونکومایسین	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)	۰(۰)

آزمون‌های مولکولی (استخراج DNA باکتریایی): برای استخراج DNA از هر ایزوله باکتریایی از روش جوشاندن براساس پروتکل پیشین Rahimi و همکاران در سال ۲۰۲۴ استفاده شد (۱۷). براین‌اساس یک لوپ پر از باکتری در ۲۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر استریل در یک میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتر به‌خوبی مخلوط و ورتکس شد و سپس سوسپانسیون حاصل در دستگاه ترموبلاک (HPN-24، پدیده نوژن پارس) در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. پس از این مدت، میکروتیوب‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (ARM-500، ارمغان طب ایرانیان) به‌مدت ۲۰ دقیقه در g × ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و درنهایت ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی هر میکروتیوب به‌عنوان DNA الگو برای انجام آزمون‌های مختلف PCR مورد استفاده قرار گرفت. DNA استخراج‌شده در فریزر یا یخچال نگهداری نشده و استخراج DNA جهت انجام هر واکنش PCR به‌صورت روزانه انجام گرفت.

جدول ۵. فراوانی ژن‌های مربوط به عوامل حدت مختلف در سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی به تفکیک هر گونه.

ژن عوامل حدت	تعداد (درصد)							تعداد کل
	گونه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی							
	I. کپیتیس	*I. کروموژنز*	*I. اپیدرمیدیس*	*I. همولیتیکوس*	*I. یمولانس*	*I. سیوری*	*I. وارنری*	
sea	۳(۳۳)	۰(۰)	۲۴(۴۹)	۲(۱۸)	۵(۳۶)	۸(۴۰)	۳(۲۵)	۴۵(۳۶)
sec	۲(۲۲)	۱(۱۰)	۴(۸)	۱(۹)	۱(۷)	۲(۱۰)	۱(۸)	۱۲(۱۰)
seg	۰(۰)	۲(۲۰)	۷(۱۴)	۴(۳۶)	۱(۷)	۵(۲۵)	۲(۱۷)	۲۱(۱۷)
seh	۰(۰)	۰(۰)	۲(۴)	۱(۹)	۱(۷)	۱(۵)	۰(۰)	۵(۴)
sek	۳(۳۳)	۰(۰)	۲۴(۴۹)	۰(۰)	۵(۳۶)	۸(۴۰)	۳(۲۵)	۴۳(۳۴)
sem	۱(۱۱)	۱(۱۰)	۰(۰)	۲(۱۸)	۴(۲۹)	۴(۲۰)	۰(۰)	۱۲(۱۰)
sen	۱(۱۱)	۰(۰)	۳(۶)	۱(۹)	۲(۱۴)	۲(۱۰)	۱(۸)	۱۰(۸)
seo	۰(۰)	۱(۱۰)	۴(۸)	۱(۹)	۰(۰)	۲(۱۰)	۰(۰)	۸(۶)
sep	۱(۱۱)	۰(۰)	۲(۴)	۰(۰)	۰(۰)	۱(۵)	۰(۰)	۴(۳)
seq	۳(۳۳)	۰(۰)	۲۴(۴۹)	۲(۱۸)	۵(۳۶)	۸(۴۰)	۳(۲۵)	۴۵(۳۶)
hla	۰(۰)	۰(۰)	۴(۸)	۷(۶۳)	۱(۷)	۰(۰)	۰(۰)	۱۲(۱۰)
hlb	۰(۰)	۰(۰)	۵(۱۰)	۸(۷۳)	۳(۲۱)	۰(۰)	۰(۰)	۱۶(۱۳)
pvl	۱(۱۱)	۱(۱۰)	۰(۰)	۰(۰)	۱(۷)	۱(۵)	۰(۰)	۴(۳)

شناسایی سویه‌های مختلف: به دنبال استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی اولیه ایزوله‌های کواگولاز منفی *استافیلوکوکوس*، تمام ایزوله‌ها با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) براساس چرخه حرارتی و شرایطی که پیش‌تر در مطالعات اشاره شده است، مورد تأیید قرار گرفتند (۱۸، ۱۹).

بررسی حضور ژن‌های *mecA* و *mecC* در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس* مقاوم به متی‌سیلین: پس از تعیین مقاومت سویه‌های مختلف نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسی تین و انتخاب سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، جهت شناسایی ژن‌های *mecA* و *mecC*، در میان این سویه‌ها از دو آزمون PCR جداگانه و پرایمرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۱) براساس دستورالعمل‌های پیشین استفاده شد (۲۰، ۲۱).

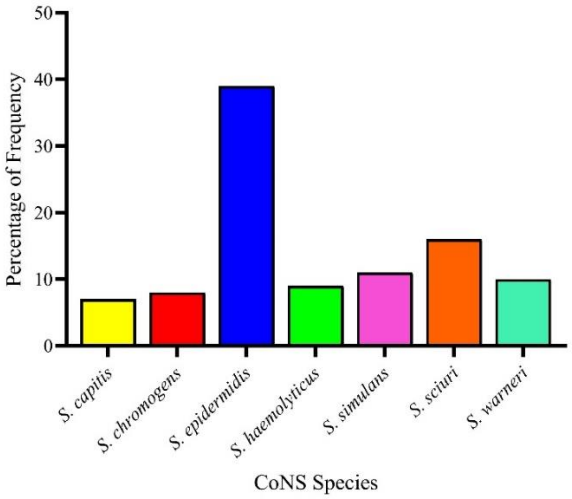
تعیین حضور ژن‌های مربوط به عوامل حدت در میان سویه‌ها: جهت بررسی حضور ژن‌های مربوط به توکسین‌های SEA-SEQ در میان سویه‌ها از دو آزمون multiplex-PCR جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن انتروتوکسینی براساس دستورالعمل Rahimi و همکاران در سال ۲۰۱۹ استفاده شد (۲۲). همچنین برای تعیین فراوانی ژن‌های *pvl*، *tst* (۲۳) و همولیزین‌ها (β، α و γ) (۵) نیز از آزمون‌های PCR مختلف استفاده شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: در مطالعه حاضر به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از آزمون Chi-Square و نرم‌افزار GraphPad Prism 8 استفاده شد.

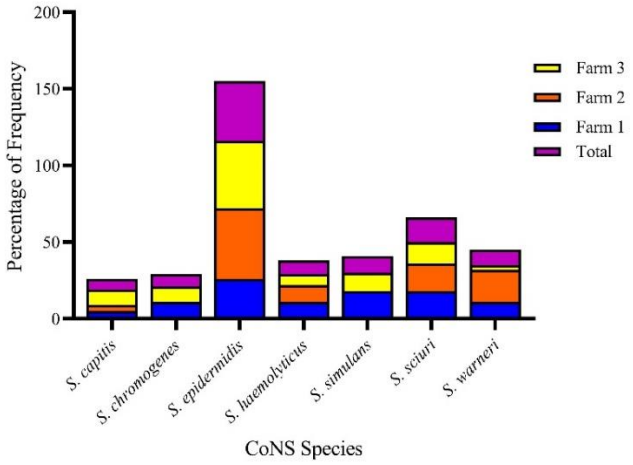
نتایج

جداسازی و شناسایی سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی: در مطالعه حاضر درمجموع ۳۱۸ گاو شیرده از سه دامداری مختلف در حومه شهر کرج انتخاب شدند و درنهایت ۱۲۵ ایزوله (۳۹ درصد) *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی از نمونه‌های شیر دام‌های انتخابی جداسازی شد که با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و PCR مورد شناسایی و تأیید قرار گرفتند. فراوانی هریک از گونه‌های مربوط به استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی در تصویر ۱ آورده شده است. براین‌اساس مشخص شد بیشترین فراوانی در نمونه شیرهای آلوده متعلق به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* است (۳۹ درصد) و پس از آن گونه‌های *استافیلوکوکوس سیوری* (۱۶ درصد)، *استافیلوکوکوس سیمولانس* (۱۱ درصد) و *استافیلوکوکوس وارنری* (۱۰ درصد) از بیشترین فراوانی برخوردار بودند. همچنین کمترین فراوانی نیز به‌ترتیب متعلق به *استافیلوکوکوس کپیتیس* (۷ درصد)، *استافیلوکوکوس کروموژنز* (۸ درصد) و *استافیلوکوکوس همولیتیکوس* (۹ درصد) بود. ازطرف‌دیگر، فراوانی هر گونه در سه دامداری موردبررسی نیز در تصویر ۲ نشان داده شده است. از مجموع ۱۲۵ سویه جداسازی‌شده، به‌ترتیب ۵۹ (۴۷/۲ درصد)، ۳۸ (۳۰/۴ درصد) و ۲۸ (۲۲/۴ درصد) سویه از دامداری‌های شماره ۳، ۱ و ۲ جداسازی شدند. همچنین تمام ۷ گونه شناسایی‌شده در مطالعه حاضر در دامداری‌های شماره ۱ و ۳ حاضر بودند، اما دو گونه *استافیلوکوکوس سیمولانس* و *استافیلوکوکوس کروموژنز* در نمونه‌های شیر مربوط به دامداری شماره ۲

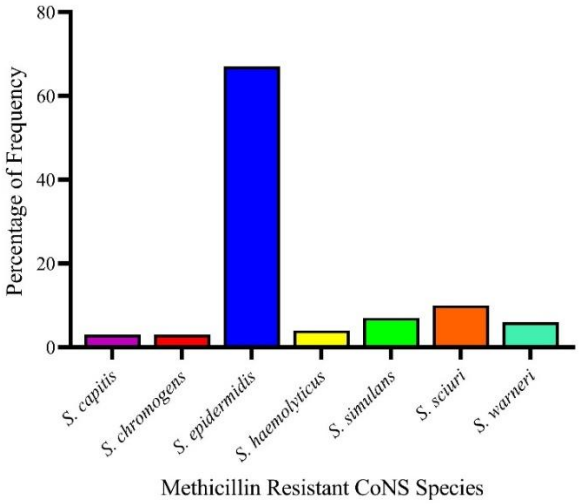
شناسایی نشدند. ازطرف‌دیگر، در دامداری‌های شماره ۱ و ۳ بیشترین فراوانی به‌ترتیب متعلق به گونه‌های *اپیدرمیدیس*، *سیمولانس* و *سیوری* و در دامداری شماره ۲ این فراوانی به‌ترتیب مربوط به گونه‌های *اپیدرمیدیس*، *وارنری* و *سیوری* بود.



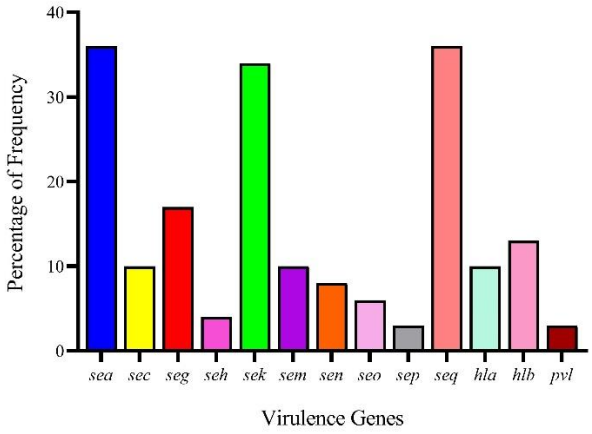
تصویر ۱. فراوانی گونه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی در نمونه‌های شیر آلوده.



تصویر ۲. فراوانی گونه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی در نمونه‌های شیر در دامداری‌های موردنظر.



تصویر ۳. فراوانی گونه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین در نمونه‌های شیر ۳ دامداری.



تصویر ۴. فراوانی ژن‌های مربوط به عوامل حدت در سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی.

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها: براساس نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های متعلق به ۷ گونه موردشناسایی در مطالعه حاضر مشخص شد که از مجموع ۱۲۵ سویه جداسازی‌شده، ۶۹ سویه (۵۵ درصد) نسبت به اگزاسیلین مقاومت نشان دادند و به‌عنوان سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین انتخاب شدند (تصویر ۳). بیشترین فراوانی گونه‌های مقاوم به متی‌سیلین به‌ترتیب مربوط به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۶۷ درصد)، *استافیلوکوکوس سیوری* (۱۰ درصد) و *استافیلوکوکوس سیمولانس* (۷ درصد) بود. همچنین مقاومت کلی سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی‌سیلین، تتراسایکلین، تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول، جنتامایسین، ریفامپین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، کلیندامایسین، لینزولاید، مینوسایکلین، نیتروفورانتوئین و ونکومایسین نیز به‌ترتیب ۷۹، ۸۴، ۷۱، ۶۵، ۴۸، ۳۹، ۷۷، ۰، ۶۱، ۰، ۴۳، ۲۹ و ۰ درصد بود (جدول ۲). در میان سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، به‌ترتیب ۱۰۰، ۹۴، ۹۴، ۸۷، ۸۷ و ۸۰ درصد سویه‌ها به‌ترتیب نسبت به پنی‌سیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین، کلیندامایسین و تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول مقاوم بودند، اما ۶۴، ۶۱، ۵۵، ۵۲ و ۴۶ درصد سویه‌های حساس به متی‌سیلین به‌ترتیب مقاوم به پنی‌سیلین، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول بودند.

همچنین تمام سویه‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین نسبت به ونکومایسین، لینزولاید و کلرامفنیکل حساس بودند. علاوه‌براین در مقایسه سویه‌های حساس به متی‌سیلین نسبت به سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین، اختلاف معنی‌داری در مقاومت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها ($P<0/0001$)، مشاهده شد. علاوه‌براین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر گونه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده به تفکیک نیز در جدول ۳ مشخص شده است که دراین‌میان *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از مقاومت بالاتری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار بود و پس از آن گونه‌های *سیوری* و *وارنری* در مراتب بعدی قرار داشتند.

ازطرف‌دیگر، براساس نتایج حاصل از تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر ۷ گونه مقاوم به متی‌سیلین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده (جدول ۴) مشخص شد تمام گونه‌ها نسبت به پنی‌سیلین مقاوم بودند و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بالاترین میزان مقاومت نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان داد و گونه *کروموژنز* کاملاً نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، تتراسایکلین، نیتروفورانتوئین و مینوسایکلین حساسیت نشان داد. همچنین بیشترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین متعلق به گونه‌های *اپیدرمیدیس* (۱۰۰ درصد)، *کروموژنز* (۱۰۰ درصد) و *سیوری* (۱۰۰ درصد)، سیپروفلوکساسین مربوط به گونه‌های *اپیدرمیدیس* (۱۰۰ درصد)، *همولیتیکوس* (۱۰۰ درصد)، *سیوری* (۱۰۰ درصد) و *وارنری* (۱۰۰ درصد) و تتراسایکلین مربوط به گونه‌های *اپیدرمیدیس* (۹۴ درصد)، *سیوری* (۸۶ درصد) و *وارنری* (۷۵ درصد) بود.

در میان گونه‌های مختلف، به‌ترتیب ۹۸، ۶۷، ۶۵، ۶۴، ۶۳، ۶۰ و ۵۶ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس وارنری*، *استافیلوکوکوس سیوری*، *استافیلوکوکوس سیمولانس*، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس کروموژنز* و *استافیلوکوکوس کپیتیس* واجد مقاومت چندگانه بودند. در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین نیز مقاومت چندگانه در میان گونه‌های

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، *استافیلوکوکوس سیوری*، *استافیلوکوکوس سیمولانس*، *استافیلوکوکوس وارنری*، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس کروموژنز* و *استافیلوکوکوس کپیتیس* محدود به ۱۰۰، ۸۶، ۸۰، ۷۵، ۶۳، ۶۰ و ۵۶ درصد سویه‌ها بود.

تعیین ژن‌های مربوط به عوامل حدت: در مطالعه حاضر تمام ۶۹ سویه *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین واجد ژن *mecA* بودند و ژن *mecC* در هیچ‌کدام از سویه‌ها شناسایی نشد. همچنین از میان تمام ژن‌های مربوط به عوامل حدت موردبررسی، ژن‌های انتروتوکسین‌های *sea*، *sec*، *seg*، *seh*، *sek*، *sem*، *sen*، *seo*، *sep* و *seq* (مربوط به ایجاد مسمومیت غذایی) و همچنین ژن‌های *hla*، *hlb* و *pvl* در میان سویه‌ها شناسایی شدند (جدول ۵ و تصویر ۴). براین‌اساس، بیشترین فراوانی مربوط به ژن‌های *sea* (۳۶ درصد)، *seq* (۳۶ درصد) و *sek* (۳۴ درصد) بود. همچنین، ۱۷، ۱۳، ۱۰، ۱۰ و ۱۰ درصد سویه‌ها به‌ترتیب واجد ژن‌های *seg*، *hlb*، *hla*، *sec* و *sem* بودند. *استافیلوکوکوس کروموژنز* واجد کمترین تعداد ژن‌های مربوط به عوامل حدت (۵ ژن) بود و در مقابل بیشترین تعداد ژن‌های عوامل حدت نیز در گونه‌های *سیوری*، *اپیدرمیدیس* و *سیمولانسس* (۱۱ ژن) شناسایی شد.

بحث

ورم پستان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های اقتصادی گاوهای شیری در ایران و بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود. شناسایی عامل ایجاد بیماری و همچنین اتخاذ پروتکل‌های درمانی مناسب همواره یک چالش بزرگ برای دامپزشکان و کشاورزان بوده است (۱)؛ بنابراین انجام مطالعات دقیق و جامع در تمام کشورها با هدف آگاهی از شیوع باکتری‌های مختلف، تعیین انتشار کلونال، عوامل حدت و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها جهت انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان و همچنین آگاهی از همه‌گیری و انتشار عفونت‌های داخل‌پستانی کاملاً ضروری به نظر می‌رسد. در مقایسه با عفونت‌های ناشی از استافیلوکوک‌های کواگولاز مثبت، استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی به‌عنوان عوامل نوظهور شیوع عفونت ورم پستان دام در ایران محسوب می‌شوند که اطلاعات اندکی نیز از فراوانی گونه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی در اختیار می‌باشد. در مطالعه حاضر ۳۹ درصد شیرهای موردبررسی (۱۲۵ نمونه از ۳۱۸ نمونه شیر جمع‌آوری‌شده) آلوده به گونه‌های مختلف *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی بودند که در مقایسه با مطالعه Ebrahimi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در شهرکرد (۴۰ درصد) (۲۴) از شیوع نسبتاً برابری برخوردار می‌باشند. در مطالعه‌ای در قم در سال ۲۰۱۲ شیوع سویه‌های کواگولاز منفی *استافیلوکوکوس* ۱۳/۸۲ درصد گزارش گردید (۲۵) که بسیار پایین‌تر از مطالعه حاضر است. در اتیوپی در سال ۲۰۲۴ شیوع استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی ۲۸/۶ درصد (۵) و در هند نیز در سال ۲۰۲۲ این فراوانی ۶۰ درصد گزارش گردید (۶). به‌طورکلی فراوانی جدایه‌های باکتریایی از نمونه‌های عفونت‌های ورم پستان و همچنین نمونه‌های شیر تحت تأثیر عواملی مانند شیوه‌های مختلف بهداشتی و مدیریتی و همچنین اتخاذ تصمیمات پیشگیرانه در هر دامداری یا مزرعه پرورش دام، سن و نژاد دام‌ها و همچنین سیستم‌های سنتی یا صنعتی مورداستفاده برای شیردوشی دام قرار دارد.

در مطالعه حاضر، درمجموع ۷ گونه مختلف *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی شامل *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۳۹ درصد)، *استافیلوکوکوس سیوری* (۱۶ درصد)، *استافیلوکوکوس سیمولانس* (۱۱ درصد)، *استافیلوکوکوس وارنری* (۱۰ درصد)، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس* (۹ درصد)، *استافیلوکوکوس کروموژنز* (۸ درصد) و *استافیلوکوکوس کپیتیس* (۷ درصد) با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی با پرایمرهای اختصاصی مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ در شهرکرد، هیچ‌کدام از استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی در حد گونه شناسایی نشدند (۲۴). در هندوستان در سال ۲۰۲۲ نیز با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی گونه‌های *استافیلوکوکوس کوهنی*، *استافیلوکوکوس سیمولانس*، *استافیلوکوکوس کپیتیس*، *استافیلوکوکوس زایلوزوز* و *استافیلوکوکوس لوگدونسیس* (*Staphylococcus lugdunensis*) و با استفاده از آزمون‌های مولکولی گونه‌های *استافیلوکوکوس شلیفری* (*Staphylococcus schleiferi*)، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس سیوری* و *استافیلوکوکوس کروموژنز* از نمونه‌های مربوط به ورم پستان دام شناسایی شدند (۶). همچنین در مطالعه دیگری در اتیوپی در سال ۲۰۲۴، ۸ گونه *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی شامل *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس سیوری*، *استافیلوکوکوس سیمولانس*، *استافیلوکوکوس وارنری*، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس کروموژنز*، *استافیلوکوکوس کوهنی* و *استافیلوکوکوس کپیتیس* از نمونه‌های شیر جداسازی شدند (۵). در مطالعات مختلف در سال‌های ۲۰۱۲، ۲۰۱۳ و ۲۰۱۷ در بلژیک، کانادا و آرژانتین گونه‌های *اپیدرمیدیس*، *همولیتیکوس*، *سیوری*، *زایلوزوز*، *سیمولانس*، *هایکوس*، *وارنری* و *کپیتیس* در نمونه‌های ورم پستان دام شناسایی شده‌اند (۳، ۲۶، ۲۷). همچنین با استفاده از تکنیک

اسپکترومتری جرمی مالدی تاف (MALDI-TOF Mass Spectrometry) نیز ۱۹ گونه مختلف در نمونه‌های ورم پستان دام در سوئیس شناسایی شدند که گونه‌های *زایلوزوز*، *کروموژنز*، *همولیتیکوس* و *سیوری* غالب‌ترین گونه‌ها بودند (۲۸). در مطالعه‌ای در بلژیک در سال ۲۰۱۷، ۲۵ گونه مختلف *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی از نمونه‌های شیر جداسازی شدند که گونه‌های *استافیلوکوکوس ایکوروم*، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس کروموژنز* فراوان‌ترین گونه‌ها بودند (۲۹). در سال ۲۰۱۶ در آرژانتین، گونه‌های *کروموژنز*، *همولیتیکوس*، *وارنری*، *زایلوزوز*، *سیمولانس*، *اپیدرمیدیس* و *هایکوس* از نمونه‌های ورم پستان دام جداسازی شدند (۳۰). نکته حائز اهمیت در مطالعه حاضر انطباق نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی بر یکدیگر بود که مغایر با یافته‌های Bhavana و همکاران در سال ۲۰۲۲ (۶) می‌باشد که در آن مطالعه نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی 16S rDNA با یکدیگر متفاوت بودند و براین‌اساس توالی‌یابی را به‌عنوان روش استاندارد طلایی جهت شناسایی گونه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی معرفی کردند.

به‌طورکلی براساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان اذعان کرد آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در مقایسه با آزمون‌های بیوشیمیایی و همچنین توالی‌یابی روشی سریع، دقیق، اختصاصی و مقرون‌به‌صرفه جهت شناسایی گونه‌های مختلف باکتریایی، ازجمله استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی می‌باشد. میزان بالاتر جداسازی گونه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی از نمونه‌های شیر و ورم پستان دام می‌تواند احتمالاً ناشی از تولید بیوفیلم توسط این سویه‌ها باشد که باعث ایجاد مقاومت فزاینده در باکتری‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضدمیکروبی و همچنین تقویت فرار از سیستم ایمنی بدن دام‌ها می‌شود (۳۱، ۳۲). همچنین سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی عمدتاً از ورم پستان تحت بالینی جداسازی می‌شوند که این خود باعث می‌شود عامل بیماری‌زا ناشناخته باقی بمانند و طبیعتاً امکان درمان آن‌ها نیز وجود نخواهد داشت (۵). ازطرف‌دیگر، شیوع بالای سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی در مطالعه حاضر همچنین می‌تواند ناشی از آداپته شدن و انطباق گونه‌های مختلف کواگولاز منفی با بافت پستان دام‌ها و همچنین سازگاری آن‌ها با پروتکل‌های درمانی مورداستفاده در دامداری‌های موردبررسی باشد.

براساس نتایج حاصل از آزمون تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مشخص شد ۵۵ درصد سویه‌ها درمجموع نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند و به‌عنوان مقاوم به متی‌سیلین دسته‌بندی شدند و ۷۹، ۸۴، ۷۱، ۶۵، ۴۸، ۳۹، ۷۷، ۰، ۶۱، ۰، ۴۳، ۲۹ و ۰ درصد نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی‌سیلین، تتراسایکلین، تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول، جنتامایسین، ریفامپین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل، کلیندامایسین، لینزولاید، مینوسایکلین، نیتروفورانتوئین و ونکومایسین مقاوم بودند. در مطالعه Phophi و همکاران در سال ۲۰۱۹ در آفریقای جنوبی، ۱۶ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مقاوم به متی‌سیلین بودند (۳۳). همچنین ۹۰ درصد سویه‌ها حداقل نسبت به یک آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند و بیشترین میزان مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۸۸ درصد) و اریترومایسین (۶۴ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به ونکومایسین (۹ درصد) مشاهده شد. علاوه‌براین ۵۱ درصد سویه‌ها واجد مقاومت چندگانه بودند. در گونه *کروموژنز*، ۶۳ و ۵۴ درصد سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین و اریترومایسین مقاوم بودند و ۵۲ درصد سویه‌ها مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها داشتند. در گونه *اپیدرمیدیس* ۶۵ درصد واجد مقاومت چندگانه بودند و ۸۲، ۳۵ و ۱۲ درصد سویه‌ها نسبت به پنی‌سیلین، اگزاسیلین و ونکومایسین مقاومت نشان دادند. در گونه *همولیتیکوس*، ۴۴ درصد سویه‌ها مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده نشان دادند و ۵۶ و ۱۳ درصد مقاومت نسبت به پنی‌سیلین و اگزاسیلین در این سویه‌ها مشاهده شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر بالاتر از مطالعات انجام‌گرفته در سایر کشورها، ازجمله هندوستان، آفریقای جنوبی و سوئد بود (۶، ۳۳-۳۵). علاوه‌براین، در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۴ در اتیوپی ۳۷/۵ درصد سویه‌ها نسبت به اگزاسیلین مقاوم بودند و ۵۴/۲ درصد سویه‌ها نیز واجد مقاومت چندگانه بودند (۵). همچنین ۵۱/۸، ۲۷/۷، ۴۹/۴، ۴۳/۴ و ۳۹/۸ درصد مقاومت نسبت به پنی‌سیلین، جنتامایسین، اریترومایسین، تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول و تتراسایکلین در میان سویه‌ها مشاهده شد و ۵۴ درصد نیز واجد مقاومت چندگانه بودند. Ebrahimi و همکاران در سال ۲۰۱۴ در شهرکرد نیز مقاومت بالایی را نسبت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش کردند (۲۴). به نظر دلیل اصلی این تفاوت، ناشی از استراتژی‌های به کار گرفته‌شده جهت درمان عفونت‌های دام‌ها در کشورها و شهرهای مختلف توسط دامپزشکان و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است. همچنین در بسیاری از موارد دامداران به‌صورت خودسرانه جهت درمان عفونت‌ها اقدام می‌کنند که این استفاده نابجا و نادرست خود از عوامل اصلی ایجاد مقاومت محسوب می‌شود. باتوجه‌به اینکه دامداری‌های ۳ و ۱ در منطقه کردان کرج و در فاصله نزدیک از یکدیگر واقع شده‌اند و دامداری شماره ۲ در منطقه آسارا قرار داشت، براساس تفاوت در فراوانی

گونه‌ها و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً این سویه‌های منتشرشده در دو منطقه متعلق به کلون تایپ‌های متفاوتی می‌باشند که در این مناطق و در دامداری‌ها و احتمالاً افراد مرتبط کلونیزه شده و در گردش می‌باشند که نیازمند انجام بررسی‌های دقیق‌تر با استفاده از تکنیک‌های تایپینگ جهت تعیین دقیق انتشار کلونال این سویه‌ها می‌باشد.

تمام سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در مطالعه حاضر واجد ژن *mecA* بودند که متفاوت و بسیار بالاتر از گزارشات سایر کشورها، ازجمله هندوستان در سال ۲۰۲۴ (۲۱/۷ درصد) (۵)، ترکیه در سال ۲۰۲۳ (۲۵ درصد) (۷)، انگلستان در سال ۲۰۱۵ (۲۹/۵ درصد) (۳۶)، نپال در سال ۲۰۲۰ (۷۰/۷ درصد) (۱۱)، نیجریه در سال ۲۰۱۷ (۳۰/۵ درصد) (۳۷)، ایران در سال ۲۰۲۰ (۵۵ درصد) (۸) و فنلاند در سال ۲۰۱۵ (۵ درصد) (۳۸) است. این یافته کاملاً منطبق با سایر مطالعات انجام‌گرفته در کشور بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* است که تمام سویه‌ها ازنظر حضور ژن *mecA* مثبت بودند (۱۰، ۱۷، ۳۹-۴۴) که این خود مؤید انتشار کلون تایپ‌های مشخص واجد خصوصیات مشابه در میان انسان‌ها و حیوانات در ایران است که به‌راحتی نیز در حال انتقال و انتشار در کشور می‌باشند، کمااینکه پیش‌تر این سویه‌های واجد ژن *mecA* از نمونه‌های محیطی و دامی و فراورده‌های آن‌ها نیز در ایران جداسازی شده‌اند (۲۲، ۴۵-۴۹).

در مطالعه حاضر برای نخستین مرتبه طیف وسیعی از ژن‌های مربوط به عوامل حدت در میان سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مورد بررسی قرار گرفتند که مجموعه‌ای از ژن‌های انتروتوکسینی مختلف و همولیزین‌ها همراه با ژن مربوط به لوکوسیدین پنتون ـ ولنتاین در این سویه‌ها شناسایی شدند. براین‌اساس، ژن‌های مربوط به انتروتوکسین‌های SEA (۳۶ درصد)، SEQ (۳۶ درصد) و SEK (۳۴ درصد) فراوان‌ترین ژن‌های مربوط به عوامل حدت در مطالعه حاضر بودند. در مطالعات انجام‌گرفته بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی‌شده از نمونه‌های بالینی، دامی و محیطی در ایران تاکنون ۱۰۰ درصد سویه‌ها واجد این ۳ ژن بودند و سایر ژن‌های انتروتوکسینی و عوامل حدت نیز قبلاً در میان سویه‌ها گزارش شده بودند (۱۷، ۲۲، ۲۳، ۴۰، ۴۲، ۴۴، ۴۷، ۴۸)، بنابراین حضور این ژن‌ها در گونه‌های کواگولاز منفی نیز مورد انتظار بود. در مطالعه‌ای در شهر همدان در سال ۲۰۲۰ ژن‌های *sec* (۴۸/۴ درصد)، *seb* (۲۷/۵ درصد)، *see* (۱۲/۱ درصد)، *sem* (۵/۵ درصد)، *seh* (۴/۴ درصد)، *sed* (۳/۳ درصد) و *sea* (۲/۲ درصد) در میان سویه‌های کواگولاز منفی شناسایی شدند (۹) که متفاوت با مطالعه حاضر می‌باشد. در آن مطالعه، ژن‌های انتروتوکسینی به‌ترتیب در ۴۶، ۶۱، ۸۰ درصد گونه‌های *اپیدرمیدیس*، *همولیتیکوس* و *ساپروفیتیکوس* حاضر بودند. در مطالعه دیگری، ژن‌های *sea* و *seb* به‌عنوان شایع‌ترین ژن‌های انتروتوکسینی در میان گونه‌های *استافیلوکوکوس* عامل ورم پستان گاو معرفی شدند (۵۰). در برزیل در سال ۲۰۰۸، ژن‌های انتروتوکسینی در ۷۰ درصد از سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی عامل ایجاد مسمومیت غذایی حاضر بودند که فراوانی ژن‌های *sea* و *seb* به‌ترتیب ۳۸ و ۲۹ درصد گزارش شد و ژن‌های *sec* و *sed* نیز به‌ندرت در سویه‌ها یافت شدند (۵۱). در مطالعه حاضر برخلاف چند مطالعه که پیش‌تر به آن‌ها اشاره شد، هیچ‌کدام از سویه‌ها ازنظر ژن *seb* مثبت نبودند. درحالی‌که Nasaj و همکاران در سال ۲۰۲۰ حضور هم‌زمان این دو ژن را به موقعیت کروموزومی یکسان آن‌ها نسبت داده بودند (۹). به نظر می‌رسد باتوجه‌به ماهیت باکتریوفاژی ژن *sea* و ماهیت پلاسمیدی ژن *seb* می‌توان عدم حضور ژن *seb* در میان سویه‌های موردبررسی را به فقدان پلاسمیدهای مربوطه در این سویه‌ها نسبت داد. همچنین ژن‌های مربوط به همولیزین‌های HLA و HLB نیز در سویه‌های کواگولاز منفی شناسایی شدند. نکته حائز اهمیت حضور ۱۱ ژن مربوط به عوامل حدت در گونه‌های *سیوری*، *اپیدرمیدیس* و *سیمولانسس* در مطالعه حاضر بود که بسیار بیشتر از سایر مطالعات مشابه می‌باشد. به‌عنوان‌مثال، در مطالعه‌ای در شهرکرد در سال ۲۰۱۴ تنها دو ژن مربوط به همولیزین‌های آلفا (۶/۰۶ درصد) و دلتا (۴۵/۴ درصد) در میان سویه‌های کواگولاز منفی شناسایی گردید (۲۴). در اتیوپی نیز فراوانی ژن‌های *hla* و *hlb* به‌ترتیب ۸/۴ و ۹/۶ درصد گزارش گردید (۵). در مطالعه Nasaj و همکاران در سال ۲۰۲۰، ۸۷/۹، ۵۶ و ۴۷/۳ درصد سویه‌ها واجد ژن‌های *hla*، *hld* و *hlb* بودند (۸). ژن‌های *pvl*، *hlb*، *sec* و *hla* به‌ترتیب در ۲۲/۱، ۹/۶، ۹/۶ و ۸/۴ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی شناسایی شدند. در مطالعه حاضر ۳ درصد سویه‌ها حامل ژن *pvl* بودند که پایین‌تر از مطالعات انجام‌گرفته در اتیوپی در سال ۲۰۲۴ (۲۲/۱ درصد)، هند در سال ۲۰۲۴ (۶/۵ درصد) و ترکیه در سال ۲۰۲۳ (۳۰/۸ درصد) می‌باشد (۵، ۷، ۵۲). به‌طورکلی تفاوت در فراوانی ژن‌های حدت میان گونه‌ها و سویه‌های استافیلوکوک در مطالعه حاضر نسبت به سایر مطالعات، می‌تواند تحت تأثیر تفاوت‌های جغرافیایی و ساختار ژنتیکی ایزوله‌ها باشد. بسیاری از ژن‌های حدت در استافیلوکوک‌ها (اعم از کواگولاز مثبت و منفی) بر روی عناصر ژنتیکی متحرک (مانند پلاسمیدها یا فازهای لیزوژن)

قرار دارند؛ بنابراین تفاوت در حضور یا عدم حضور این عناصر می‌تواند دلیل اصلی تفاوت میان سویه‌ها باشد. درنتیجه به نظر می‌رسد در مناطق مختلف، کلون‌تایپ‌های متفاوتی در گردش می‌باشند که ازنظر ژن‌های حدت و ویژگی‌های بیماری‌زایی با یکدیگر متفاوت‌اند.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان‌دهنده شیوع بالای سویه‌های *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی مقاوم و حساس به متی‌سیلین واجد مقاومت آنتی‌بیوتیک چندگانه و همچنین طیف وسیعی از عوامل حدت و به‌ویژه انتروتوکسین‌ها و همولیزین در میان نمونه‌های شیر دام‌های مبتلا به ورم پستان در دامداری‌های موردنظر در کرج است. این شیرها که ازنظر ظاهری کاملاً سالم به نظر می‌رسند از خطر بالایی برای مصرف‌کنندگان و افراد و پرسنلی که تماس مستقیم با آن‌ها دارند برخوردار می‌باشد. باتوجه‌به حدت و مقاومت بالای برخی از این سویه‌ها، مطرح شدن احتمال منشأ انسانی یا بیمارستانی بودن آن‌ها نیازمند بررسی‌های تایپینگ مولکولی است. ازآنجاکه مطالعه حاضر محدود به سه دامداری در یک منطقه جغرافیایی خاص بود، انجام پایش‌های گسترده‌تر در سطح کشور به‌منظور تعیین الگوی مقاومت، عوامل حدت و بررسی انتشار کلونال سویه‌ها ضروری به نظر می‌رسد. باتوجه‌به مصرف بی‌رویه و ناآگاهانه آنتی‌بیوتیک‌ها، تعیین الگوی مقاومت سویه‌ها پیش از تجویز دارو جهت کنترل مؤثر عفونت و جلوگیری از گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی ضروری است. بااین‌حال درمورد استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی، باید بین سویه‌های پاتوژن و فلور طبیعی تمایز قائل شد؛ چراکه برخی از آن‌ها ممکن است به‌طور خودبه‌خودی در دوره خشکی بهبود یابند و حتی نقش حفاظتی در برابر پاتوژن‌های اصلی ایفا کنند.

نمونه‌گیری در مطالعه حاضر توسط یکی از کارشناسان خبره علوم دامی و پرسنل دامداری انجام گرفته است که با وجود رعایت موارد بهداشتی، احتمال آلودگی خفیف نمونه‌ها وجود دارد. توصیه می‌شود در مطالعات بعدی، نمونه‌گیری مستقیماً توسط دامپزشک انجام شود. همچنین ازآنجایی‌که مطالعه محدود به سه دامداری در حومه کرج است، نتایج آن به کل جمعیت گاوهای شیری ایران قابل‌تعمیم نمی‌باشد؛ بنابراین انجام مطالعات آتی با نمونه‌گیری وسیع‌تر و از مناطق مختلف توصیه می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

باتوجه‌به اینکه جهت انجام مطالعه حاضر نمونه‌گیری توسط پرسنل دامداری‌ها و با هماهنگی دامپزشکان انجام گرفته و هیچ‌گونه تماس مستقیمی با دام‌ها وجود نداشته و همچنین تمام مراحل کار نیز در آزمایشگاه پاتوبیولوژی خصوصی شخصی و بدون حمایت ارگان خاصی صورت گرفته است، هیچ‌گونه تأییدیه اخلاقی نیز برای آن اخذ نشده است؛ و تمام قوانین اخلاق در پژوهش رعایت شده است.

حامی مالی

مطالعه حاضر هیچ‌گونه کمک مالی از سازمانی‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از زنده یاد، جناب آقای مهندس اسماعیل اسماعیلی راد از محققین موسسه تحقیقات علوم دامی کشور برای هماهنگی با مراکز و همکاری در جمع‌آوری نمونه‌ها قدردانی و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافعی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. He W, Ma S, Lei L, He J, Li X, Tao J, et al. Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. Vet Microbiol. 2020;242:108570. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108570 PMID: 32122584

2. Gebremedhin EZ, Ararso AB, Borana BM, Kelbesa KA, Tadese ND, Marami LM, et al. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products, associated factors for contamination,

and their antibiogram in Holeta, Central Ethiopia. Vet Med Int. 2022;2022(1):6544705. doi: 10.1155/2022/6544705 PMID: 35574151

3. Srednik ME, Tremblay YD, Labrie J, Archambault M, Jacques M, Fernández Cirelli A, et al. Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. FEMS Microbiol Lett. 2017;364(8):fnx001. doi: 10.1093/femsle/fnx001 PMID: 28087612

4. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7th ed. Jones & Bartlett Learning. Massachusetts, United States; 2020.

5. Getahun YA, Abey SL, Beyene AM, Belete MA, Tessema TS. Coagulase-negative staphylococci from bovine milk: Antibiogram profiles and virulent gene detection. BMC Microbiol. 2024;24(1):263. doi: 10.1186/s12866-024-03415-0 PMID: 39026151

6. Bhavana R, Chaitanya R. Identification of coagulase negative staphylococcal species from bovine mastitis in India. Iran J Vet Res. 2022;23(4):358. doi: 10.22099/ijvr.2022.43698.6406

7. Seker E, Ozenc E, Turedi OK, Yilmaz M. Prevalence of *mecA* and *pvl* genes in coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms in Turkey. Anim Biotechnol. 2023;34(7):2427-32. doi: 10.1080/10495398.2022.2094802 PMID: 35792781

8. Nasaj M, Saeidi Z, Asghari B, Roshanaei G, Arabestani MR. Identification of hemolysin encoding genes and their association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci. BMC Res Notes. 2020;13:1-6. doi: 10.1186/s13104-020-4938-0 PMID: 32041651

9. Nasaj M, Saeidi Z, Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Prevalence and distribution of resistance and enterotoxins/enterotoxin-like genes in different clinical isolates of coagulase-negative *Staphylococcus*. Eur J Med Res. 2020;25:1-11. doi: 10.1186/s40001-020-00447-w PMID: 33046122

10. Rahimi F. Molecular characteristics of biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates causing urinary tract infections. Arch Clin Infect Dis. 2018;13(6):e61704. doi: 10.5812/archcid.61704

11. Shrestha LB, Bhattarai NR, Rai K, Khanal B. Antibiotic resistance and *mecA* gene characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples in Nepal. Infect Drug Resist. 2020;13:3163-9. doi: 10.2147/IDR.S274163

12. Campos B, Pickering AC, Rocha LS, Aguilar AP, Fabres-Klein MH, de Oliveira Mendes TA, et al. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: Current understanding and future perspectives. BMC Vet Res. 2022;18(1):115. doi: 10.1186/s12917-022-03197-5

13. Kerro Dego O, Vidlund J. Staphylococcal mastitis in dairy cows. Front Vet Sci. 2024;11:1356259. doi: 10.3389/fvets.2024.1356259

14. Shahzad MA, Yousaf A, Ahsan A, Irshad H, Riaz A, Khan A, et al. Virulence and resistance profiling of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the Pakistani Pothohar region. Sci Rep. 2024;14(1):14569. doi: 10.1038/s41598-024-65448-9

15. Ramuada M, Tyasi TL, Gumede L, Chitura T. A practical guide to diagnosing bovine mastitis: a review. Front Anim Sci. 2024;5:1504873. doi: 10.3389/fanim.2024.1504873

16. Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Supplement M100. 32rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 2022.

17. Rahimi F, Khashei S, Katouli M. Prevalence, diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. Arch Clin Infect Dis. 2024;19(3):e142081. doi: 10.5812/archcid-142081

18. Shome BR, Natesan K, Mitra SD, Venugopal N, Bhuvana M, Ganaie F, et al. Development of simplex-PCR assays for accurate identification of nine staphylococcal species at genus and species levels. J Microbiol Infect Dis. 2018;8(03):120-7. doi: 10.5799/jmid.458462

19. Kim J, Hong J, Lim J-A, Heu S, Roh E. Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. Arch Microbiol. 2018;200:73-83. doi: 10.1007/s00203-017-1415-9 PMID: 28795230

20. Ciesielczuk H, Xenophontos M, Lambourne J. Methicillin-resistant S*taphylococcus aureus* harboring *mec*C still eludes us in East London, United Kingdom. J Clin Microbiol. 2019;57(6):10.1128. doi: 10.1128/JCM.00020-19 PMID: 30971461

21. Rahimi F. Molecular characterization of genes encoding virulence factors among community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Tehran during 2019-2022. Iran J Infect Dis Trop Med. 2024;28(103):19-38. (In Persian).

22. Rahimi F, Shafiei R. Characteristics of enterotoxin-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from meat in Tehran, Iran. J Consum Prot Food Saf. 2019;14(4):389-98. doi: 10.1007/s00003-019-01239-z

23. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of virulence factors and prophage profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a referral hospital in Tehran, Iran. Arch Clin Infect Dis. 2018;13(5):e59385. doi: 10.5812/archcid.59385

24. Ebrahimi A, Soleimani F, Motamedi A, Shams N, Lotfalian S. Study on some characteristics of Staphylococci isolated from sheep sub clinical mastitis milk in Shahrekord, Iran. J Microb Biol. 2014;2(8):57-62.

25. Rahimi Baghi F, Nazari R, Douraghi M, Moein Rad M, Najafi R, Kalhor N. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw milks of Qom. Appl Biol. 2012;7(2):53-62.

26. Tremblay YD, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. J Dairy Sci. 2013;96(1):234-46. doi: 10.3168/jds.2012-5795 PMID: 23141829

27. Piessens V, De Vliegher S, Verbist B, Braem G, Van Nuffel A, De Vuyst L, et al. Characterization of coagulase-negative staphylococcus species from cows' milk and environment based on *bap*, *icaA*, and *mecA* genes and phenotypic susceptibility to antimicrobials and teat dips. J Dairy Sci. 2012;95(12):7027-38. doi: 10.3168/jds.2012-5400 PMID: 22999285

28. Frey Y, Rodriguez JP, Thomann A, Schwendener S, Perreten V. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. J Dairy Sci. 2013;96(4):2247-57. doi: 10.3168/jds.2012-6091 PMID: 23415536

29. De Visscher A, Piepers S, Haesebrouck F, Supré K, De Vliegher S. Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: Prevalence, distribution, and associated subgroup-and species-specific risk factors. J Dairy Sci. 2017;100(1):629-42. doi: 10.3168/jds.2016-11476 PMID: 27865514

30. Raspanti CG, Bonetto CC, Vissio C, Pellegrino MS, Reinoso EB, Dieser SA, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. Rev Argent Microbiol. 2016;48(1):50-6. doi: 10.1016/j.ram.2015.12.001 PMID: 26935912

31. Lee YJ, Lee YJ. Characterization of biofilm producing coagulase-negative staphylococci isolated from bulk tank milk. Vet Sci. 2022;9(8):430. doi: 10.3390/vetsci9080430 PMID: 36006345

32. Goetz C, Tremblay YD, Lamarche D, Blondeau A, Gaudreau AM, Labrie J, et al. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. J Dairy Sci. 2017;100(8):6454-64. doi: 10.3168/jds.2017-12629 PMID: 28624271

33. Phophi L, Petzer I-M, Qekwana DN. Antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from subclinical mastitis cow milk samples submitted to the Onderstepoort Milk Laboratory. BMC Vet Res. 2019;15:1-9. doi: 10.1186/s12917-019-2175-3

34. Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Öst M, Waller KP. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. Vet Microbiol. 2009;136(1-2):142-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.024 PMID: 19058930

35. Oguttu JW, Qekwana DN. An exploratory descriptive study of antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus* spp. isolated from horses presented at a veterinary teaching hospital. BMC Vet Res. 2017;13(1):1-11. doi: 10.1186/s12917-017-1196-z PMID: 28830437

36. Xu Z, Mkrtchyan HV, Cutler RR. Antibiotic resistance and *mec*A characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. Front Microbiol. 2015;6:947. doi: 10.3389/fmicb.2015.00947 PMID: 26441881

37. Ibadin EE, Enabulele IO, Muinah F. Prevalence of mecA gene among staphylococci from clinical samples of a tertiary hospital in Benin City, Nigeria. African Health Sciences. 2017;17(4):1000-10. doi: 10.4314/ahs.v17i4.7 PMID: 29937870

38. Taponen S, Nykäsenoja S, Pohjanvirta T, Pitkälä A, Pyörälä S. Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. Acta Vet Scand. 2015;58:1-13. doi: 10.1186/s13028-016-0193-8 PMID: 26852389

39. Danesh M, Rahimi F. Characterization of Biofilm producing *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and healthy People. Infect Epidemiol Microbiol. 2021;7(1):1-15. doi: 10.29252/iem.7.1.1

40. Rahimi F, Katouli M, Karimi S. Biofilm production among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from catheterized patients with urinary tract infection. Microb Pathog. 2016;98:69-76. doi: 10.1016/j.micpath.2016.06.031 PMID: 27374894

41. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characteristics of hospital-and community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. J Med Microbiol. 2014;63(6):796-804. doi: 10.1099/jmm.0.070722-0 PMID: 24648470

42. Rahimi F, Khashei S. Characteristics of prophage patterns and virulence gene profiles among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with diabetic foot infections in a referral hospital in Tehran, Iran. Infect Epidemiol Microbiol. 2023;9(1):15-23. doi: 10.52547/iem.9.1.15

43. Rahimi F, Khashei S. Typing and antibiotic resistance pattern of biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains with multiple drug resistance isolated from patients with urinary infection in Tehran during 2021 and 2022. Iran J Infect Dis Tropic Med. 2024;29(106):1-21.

44. Rahimi F, Shokoohizadeh L. Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains among inpatients and outpatients in a referral hospital in Tehran, Iran. Microb Pathog. 2016;97:89-93. doi: 10.1016/j.micpath.2016.06.006 PMID: 27265678

45. Rahimi F, Katouli M, Pourshafie MR. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in sewage treatment plants in Tehran, Iran. J Water Health. 2021;19(2):216-28. doi: 10.2166/wh.2021.247 PMID: 33901019

46. Torabi M, Rahimi F. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital wastewater in Tehran, Iran. Infect Epidemiol Microbiol. 2021;7(3):215-27. doi: 10292252/iem.7.3.215

47. Rahimi F, Karimi S. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains producing enterotoxins A, K and Q From chicken meat in Isfahan, Iran, 2014. Arch Clin Infect Dis. 2016;11(4):e35601. doi: 10.5812/archcid.35601

48. Rahimi F, Avarzamani M. Isolation of enterotoxin producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from chicken nugget samples in Isfahan, 2019. Iran J Infect Dis Tropic Med. 2021; 26(92):20-6.

49. Rahimi F, Karimi S. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry in Iran. Arch Clin Infect Dis. 2015;10(4):e30885. doi: 10.5812/archcid.30885

50. de Freitas Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, de Figueiredo Pantoja JC, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. J Dairy Sci. 2013;96(5):2866-72. doi: 10.3168/jds.2012-5864 PMID: 23477822

51. Veras JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Dos Santos DA, et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. Int J Infect Dis. 2008;12(4):410-5. doi: 10.1016/j.ijid.2007.09.018 PMID: 18206412

52. Mahato S, Mistry HU, Chakraborty S, Sharma P, Saravanan R, Bhandari V. Identification of variable traits among the methicillin resistant and sensitive coagulase negative staphylococci in milk samples from mastitic cows in India. Front Microbiol. 2017;8:1446. doi: 10.3389/fmicb.2017.01446