# بررسی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) حامل انواع ژن *mec* در جدایه‌های مسبب ورم پستان تحت بالینی گاو



مهری امینی کمرودی[۱]، غلامرضا هاشمی‌تبار[۲]، مهدی عسکری بدوئی*[۳]، بابک خرمیان[۴]، حمیده کلاته رحمانی[۵]

۱- دانش‌آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۵- دانش‌آموخته، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

دریافت مقاله: ۱۶ اسفند ۱۴۰۰، بازنگری: ۱۸ فروردین ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۴ اردیبهشت ۱۴۰۱

## چکیده

*استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم پستان در گاوهای شیری می‌باشد. بروز مقاومت به متی‌سیلین در این باکتری از نگرانی‌های عمده در دامپزشکی و بهداشت عمومی است. با توجه به شناسایی انواع جدیدی از ژن‌های کدکننده‌ی مقاومت به متی‌سیلین، هدف از این مطالعه بررسی حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) و انواع ژن *mec* برای نخستین بار در منطقه شمال شرق کشور می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر، هویت ۵۴ جدایه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* مسبب ورم پستان تحت بالینی گاو با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی بررسی شد. از این تعداد، تنها در ۴۴ سویه قسمت اختصاصی ژن *nuc* ردیابی شد. سپس، مقاومت جدایه‌ها به پنی‌سیلین، سفوکستین، انروفلوکساسین، تایلوزین و تری-متوپریم-سولفامتوکسازول بر اساس روش انتشار دیسک تعیین گردید. در انتها، بررسی مولکولی حضور ژن‌های *mecA*، *mecB* و *mecC* در جدایه‌ها صورت گرفت. طبق نتایج، بیشترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۵۴ درصد) و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۲۳ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به آنتی‌بیوتیک تایلوزین (۷ درصد) بود. تنها در یک جدایه (۲/۳ درصد) حضور ژن *mecA* مورد تأیید قرار گرفت، در حالی که، این جدایه در تست فنوتیپی به‌عنوان MRSA شناسایی نگردید. هیچ یک از ژن‌های *mecC* و *mecB* در این مطالعه شناسایی نشدند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در منطقه شمال شرق ایران، مقاومت به متی‌سیلین در سویه‌های ورم پستان گاو رخداد بالایی ندارد. همچنین، این مطالعه نشان می‌دهد که انواع کمتر شناخته شده ژن‌های مقاومت به متی‌سیلین در این منطقه شایع نیست. با این حال، توصیه می‌شود که مطالعات جامع‌تری در این خصوص صورت گیرد.

**واژگان کلیدی:** *استافیلوکوکوس اورئوس*، ژن *mec*، ورم پستان تحت بالینی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: askari.m@um.ac.ir

## مقدمه

*استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ورم پستان در گاوهای شیری می‌باشد که اغلب موجب بیماری ورم پستان تحت بالینی می‌گردد (۱). بیماری ورم پستان یک واکنش التهابی غدد پستانی است که معمولاً از طریق سیستم شیردوشی، دست و لباس شیردوش و ماشین شیردوشی آلوده منتقل می‌گردد (۲، ۳). گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی اغلب فاقد علائم آشکار بالینی است که نتیجه‌ی آن عدم تشخیص به موقع و تأخیر در شروع درمان است که خود می‌تواند به افزایش هزینه‌ها و طولانی‌تر شدن طول دوره درمان بینجامد (۴، ۵).

دو سال پس از معرفی پنی‌سیلین جهت درمان عفونت‌های حاصل از *استافیلوکوکوس اورئوس* درسال ۱۹۴۰، سویه مقاوم به پنی‌سیلین درسال ۱۹۴۲ پدید آمد. به دنبال راهکاری برای حل این مقاومت در سال ۱۹۶۰ از یک آنتی‌بیوتیک ساختگی از خانواده بتالاکتام (متی‌سیلین) جهت درمان سویه‌های مقاوم با موفقیت استفاده شد ولی یک سال بعد از این اتفاق، سویه‌های نوظهوری موسوم به *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*) به وجود آمدند (۶). اولین MRSA مرتبط با ورم پستان در سال ۱۹۷۵-۱۹۷۲ در کشور بلژیک گزارش شد (۷، ۸). این مقاومت ناشی از مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک جهت درمان ورم پستان و عدم انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بوده است (۹). در پنج دهه گذشته، MRSA ها اغلب به‌عنوان عامل عفونت‌های بیمارستانی مطرح بودند اما در سال‌های اخیر به‌عنوان عفونت اکتسابی از حیوان و جامعه نیز مطرح گردیده‌اند. خطرات انتقال این سویه‌های مقاوم به انسان به اثبات رسیده است و سویه ST398 از جمله دودمان‌های شناخته شده‌ای است که وابسته به حیوان بوده و اغلب از انسان‌هایی که با حیوانات در تماسند جداسازی شده است (۱۰). سویه‌های MRSA درمان ورم پستان ایجاد شده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* را با چالش مواجه می‌کند و علاوه بر آن می‌تواند سبب مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* به تمام آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی شود که در درمان ورم پستان به‌طور رایج استفاده می‌گردد (۱۰).

مقاومت در MRSA وابسته به حضور ژن‌های مقاومت با منشأ کروموزومی *mecA* و *mecC* (۱۱) یا پلاسمیدی، *mecB* است (۱۲). این ژن‌های مقاومت، پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین تغییریافته با تمایل پایین به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را کد می‌کنند (۶، ۱۲، ۱۳). ژن *mecA* و *mecC* بر روی کروموزوم همراه با ژن‌های تنظیمی *mecI*،*mecR* قرار گرفته است، ژن‌های *mecA* و *mecC* تقریباً ۶۹ درصد در سطح ژن و ۶۳ درصد در سطح آمینواسید به یکدیگر شباهت دارند و هر دو پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین را کد می‌کنند. پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین کد شده توسط ژن *mecC* نسبت به پروتئینی که توسط ژن *mecA* کد می‌شود پایداری کمتری در دمای ۳۷ درجه دارد و نسبت به اگزاسیلین حساس و نسبت به سفوکسیتین مقاوم است. پروتئین متصل شونده به پنی‌سیلین حاصل از ژن *mecA* نسبت به هردو مقاومت نشان می‌دهد (۱۴، ۱۵).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که منشأ احتمالی ژن *mecA* *استافیلوکوکوس سیوری* (*Staphylococcus ceuri*) است (۱۶). ژن *mecC* اولین بار درسال ۲۰۱۱ از نمونه‌های شیر موجود در مخزن تانک و انسان در انگلستان و ایرلند جداسازی گردید. این ژن علاوه بر گاو و انسان در دیگر گونه‌ها مانند اسب و میش و حیوانات خانگی نیز یافت شده است. به دلیل جداسازی ژن *mecC* از دیگر گونه‌های

*استافیلوکوکوس* مانند *سیوری*[*]، *استیپانوویسی*[†]، *گزایلوز*[‡]، *ساپرولایتیکوس*[§] ممکن است بتوان این گونه‌ها را نیز به‌عنوان منشأ احتمالی این ژن در نظرگرفت (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۷). ژن *mecB* اولین بار درسال ۲۰۱۸ از نمونه انسانی جداسازی گردید. این ژن بر روی پلاسمیدی قرار گرفته است که علاوه بر ژن *mecB* ، ژن مقاومت غیر بتالاکتامی را نیز کد می‌کند و به دلیل جداسازی این ژن از *میکروکوکوس کازئولیتیکوس*[**] ممکن است بتوان آن را به‌عنوان منشأ احتمالی این ژن نیز مطرح کرد (۱۲، ۱۸). مقاومت فنوتیپی در MRSA تحت شرایط کشت (دمای انکوباتور، pH محیط کشت و غیره) می‌تواند به صورت هموژنوس یا هتروژنوس بروز پیدا کند. بیشتر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت هتروژنوس از خود نشان می‌دهند. بدین معنی که همه سویه‌ها ممکن است ژن مقاومت را داشته باشند اما تعداد کمی می‌توانند آن را بیان کنند (۱۹).

مطالعات زیادی در رابطه با ردیابی ژن *mecA* از نمونه دامی در ایران و دیگر کشورها در دسترس است، اما مطالعات انجام شده در رابطه با ژن‌های *mecC* و *mecB* در این مناطق بسیار محدود است. با توجه به این که گاوشیری می‌تواند مخزن ژن *mecC* باشد ، طبق بیانیه سازمان بهداشت جهانی گونه‌های MRSA به‌عنوان عامل تهدیدکننده‌ی سلامت عموم شناخته می‌شوند و جهت مبارزه با سویه‌های مقاوم توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید در کوتاه‌ترین زمان ممکن مورد نیاز مبرم است (۲۰). درک مکانیسم مولکولی مقاومت در سویه‌های حامل این ژن‌ها و بررسی پراکندگی احتمالی آنها در مناطق جغرافیایی مختلف، می‌تواند زمینه را برای شناسایی دقیق سویه‌های مقاوم در آزمایشگاه های بالینی و تحقیقاتی و توقف انتشار سریع این سویه‌ها فراهم کند (۲۱).

در این مطالعه برای نخستین بار، حضور سویه‌های MRSA در ارتباط با انواع ژن *mec* در *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده ازعفونت ورم پستان تحت بالینی درگاوهای شیری در منطقه شمال شرق کشور مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

***الف- جمع‌آوری نمونه و تشخیص بیوشیمیایی:*** در پژوهش حاضر ۵۴ جدایه احتمالی *استافیلوکوکوس اورئوس* که از چهار فارم گاو شیری صنعتی در مشهد طی ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۸ به‌دست آمده است مورد مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که ۱۰ میکرولیتر از نمونه به‌دست آمده در بلاد آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید سپس از پرگنه‌ی رشد کرده بر روی این محیط برای انجام رنگ‌آمیزی گرم جهت بررسی مورفولوژی باکتری، برای تست کاتالاز جهت تفکیک استرپتوکوکوس از *استافیلوکوکوس اورئوس* و آزمایش DNase، کو آگولاز، تخمیر قند مانیتول جهت تشخیص گونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده گردید. ایزوله‌ها پس از انجام آزمایش‌های تشخیصی اولیه، در محیط حاوی ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- نگهداری شد. در انتها پس از کشت و خالص‌سازی مجدد، از تست‌های مقدماتی کاتالاز و اکسیداز و تخمیر قند مانیتول در محیط مانیتول سالت آگار استفاده گردید.

***ب- استخراج DNA و آزمایش زنجیره‌ای پلیمراز جهت شناسایی گونه:*** به منظور تأیید

[*] *Staphylococcus sciuri*-

[†] *stepanovicii Staphylococcus*-

[‡] *Staphylococcus xylosus*-

[§] *Staphylococcus saprophyticus*-

[**] *Macrococcus caselyticus*-

تشخیص نهایی جدایه‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* بر مبنای شناسایی قسمت اختصاصی ژن *nuc*، DNA تام جدایه‌ها با استفاده از کیت تجاری (Korea،Gene All) طبق دستورالعمل سازنده استخراج گردید (۲۲). سپس به منظور تأیید جدایه‌ها به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌وسیله یک جفت پرایمر اختصاصی ژن*nuc* (ساخت شرکت دنا زیست مشهد، ایران) استفاده شد (۲۳) (جدول ۱). در نهایت حضور ژن *nuc* در ۴۴ جدایه از ۵۴ جدایه مورد بررسی به تأیید رسید و به‌عنوان *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص نهایی داده شد.

برای انجام واکنش PCR در هر لوله‌ی اپندروف، به مقدار ۰/۳میکرومولار از هر پرایمر (Reverse ، Forward)، ۱۰میکرولیتر از مستر میکس آماده (Denmark،Ampliqon) و ۴ میکرولیتر از DNA هر جدایه اضافه کرده و با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس در دستگاه ترموسایکلر (Biorad) قرار داده شدند. مراحل انجام واکنش مطابق با جدول شماره ۲ طی گردید. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR جهت تعیین وجود ژن*nuc* درون چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد و در دستگاه ژل الکتروفورز به مدت ۴۵ دقیقه تحت ولتاژ ۱۰۰ ولت قرار گرفت. سپس از باندهای حاصله در دستگاه ترانس ایلومیناتور عکس‌برداری گردید. برای نشان دادن اندازه باندهای تکثیری از ladder DNA شرکت سینا کلون ایران (Fermentas، 1601، Lithuania)استفاده شد. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات، از ایزوله *استافیلوکوکوس اورئوس* (کلکسیون آزمایشگاه ورم پستان دانشکده دامپزشکی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. (جدول ۲).

***ج - واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت ردیابی ژن‌های mecC ،mecB ،mecA:*** برای این منظور از پرایمرهای اختصاصی (سنتز پرایمر توسط شرکت سیناکلون، ایران انجام گرفت) طراحی شده توسط Becker و همکاران در سال ۲۰۱۸ و Ishihara و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطابق با جدول شماره ۱ استفاده گردید(۱۲، ۲۴).

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز،۱۰ میکرولیتر از بافر2x آماده PCR، ۰/۵میکرومولار از هر پرایمر (Forward، Reverse) و ۴ میکرولیتر DNA اضافه کرده و به‌وسیله آب مقطر استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس در دستگاه ترموسایکلر (Biorad) قرار داده شدند. سیکل‌های حرارتی برای انجام واکنش برای ژن‌های *mecA*، *mecC*، *mecB* مطابق با جدول شماره ۲ تنظیم گردید. در نهایت به میزان ۱۲ میکرولیتر از محصول PCR جهت تعیین وجود ژن‌های مورد *بررسی* درون چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد و ۵۰ دقیقه تحت ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز گردید. از باندهای حاصله، در دستگاه ترانس ایلومیناتور با کمک اشعه UV عکسبرداری شد. برای نشان دادن اندازه باندهای تکثیری از مارکر 100bp-Plus تولیدی شرکت سینا کلون ایران استفاده شد. جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از ایزوله *mecA* MRSA مثبت (کلکسیون آزمایشگاه ورم پستان دانشکده دامپزشکی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

| ژن هدف | توالی پرایمر | اندازه باند (جفت باز) | منبع |
|---|---|---|---|
| ***nucA*** | F:CTGGCATATGTATGGCAATTGTT<br>R:TATTGACCTGAATCAGCGTTGTCT | ۶۱۳ | ۲۳ |
| ***mecA*** | F:TGTCCGTAACCTGAATCAGC<br>R: TGCTATCCACCCTCAAACAG | ۵۱۹ | ۲۴ |
| ***mecB*** | F:TTAACATATACACCCGCTTG<br>R: TAAAGTTCATTAGGCACCTCC | ۲۲۶۶ | ۱۲ |
| ***mecC*** | F:TCAAATTGAGTTTTTCCATTATCA<br>R: AACTTGGTTATTCAAAGATGACGA | ۱۹۳۹ | ۱۲ |

جدول ۲- مشخصات سیکل، زمان ودمای پرایمرهای ژن ***nucA، mecB، mecC،mecA***

| مراحل | ***nucA*** | ***mecA*** | ***mecC*** | ***mecB*** |
|---|---|---|---|---|
| دناتوراسیون اولیه (دما و زمان) | ۹۴ċ ،۵min | ۹۴ċ،۳min | ۹۴ ċ،۳min | ۹۴ċ ،۴min |
| دناتوراسیون (دما و زمان) | ۹۴ ċ , ۴۵s | ۹۴ċ،۴۵s | ۹۴ċ،۴۵s | ۹۵ċ , ۳۰s |
| اتصال (دما و زمان) | ۵۵ċ ،۴۵ s | ۵۵ċ، ۱min | ۵۵ċ، ۱min | ۵۶ċ،۱ min |
| بسط (دما و زمان) | ۷۲ċ ،۴۵ s | ۷۲ċ،۱ min | ۷۲ċ،۱ min | ۷۲ċ ،۴۵ s |
| بسط نهایی (دما و زمان) | ۷۲ċ ،۵min | ۷۲ċ،۵ min | ۷۲ċ،۵ min | ۷۲ċ،۵ min |
| تعداد سیکل‌ها | ۳۱ | ۳۳ | ۳۳ | ۳۳ |

***د- تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها:*** حساسیت جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متی‌سیلین، انروفلوکساسین (۱۰میکروگرم)، پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفوکستین (۳۰میکروگرم)، سولفامتوکسازول تری‌متوپریم (۲۳/۷۵)، تایلوزین (۳۰ میکروگرم) (ساخت شرکت پادتن طب) به روش دیسک دیفوژن بر اساس آخرین استاندارد ( Clinical laboratory Standard Institute) مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور برای کلیه جدایه‌ها سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید و در محیط مولر هینتون آگار به‌وسیله سوآپ استریل کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی بر روی محیط قرار داده شد و بعد از ۱۸ تا ۲۰ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد و نتایج بر اساس جدول استاندارد به‌صورت مقاوم، حساس، نیمه‌حساس گزارش گردید. بر اساس آخرین دستورالعمل CLSI برای شناسی فنوتیپی سویه‌های MRSA از دیسک سفوکسیتین استفاده گردید (۲۵). ۱۴ میلی‌متر یا کمتر به‌عنوان MRSA، ۱۷-۱۵ میلی‌متر به‌عنوان حساسیت نسبی و ۱۸ میلی‌متر یا بیشتر حساس در نظر گرفته شد.

## نتایج

***الف- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی:*** در

پـژوهش حاضـر ۵۴ جدایـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* اخـذ شـده از آزمایشـگاه ورم پسـتان کلینیـک دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه فردوسـی مشـهد، پـس از خـالص‌سـازی مجـدد در آزمایشـگاه میکـروب‌شناسـی بـه‌عنـوان *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* مـورد تأییـد قـرار گرفت.

***ب- نتـایج تسـت مقاومـت آنتی‌بیـوتیکی:*** در پـژوهش حاضـر از ۴۴ جدایـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس*، ۲۴ (۵۴ درصـد) ایزولـه، ۱۰(۲۳ درصـد) ایزولـه، ۳ (۷ درصـد) ایزولـه بـه‌ترتیـب نسـبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای پنـی‌سـیلین، سولفامتوکسـازول-تـری‌متـوپریم، تـایلوزین مقاومـت نشـان دادنـد و مقاومـت نسـبت بـه سفوکسـیتین و انروفلوکساسـین مشـاهده نگردیـد و همچنـین ۲۰ (۴۵ درصـد) ایزولـه، ۳۴ (۷۷ درصـد) ایزولـه، ۴۴ (۹۳ درصـد) ایزولـه،۴۴ (۱۰۰ درصـد) ایزولـه،۴۳ (۹۸ درصـد) ایزولـه، بـه‌ترتیـب نسـبت بـه آنتـی‌بیوتیـک‌هـای پنـی‌سـیلین، سولفامتوکسـازول تـری‌متـوپریم، تـایلوزین، سفوکسـیتین و انروفلوکساسـین حساسـیت نشـان دادنـد. همچنـین، ۱ (۲ درصـد) جدایـه درای مقاومـت متوسـط بـه انروفلوکساسـین گـزارش گردیـد. (جـدول۲ و نمودار ۱).

***د- نتـایج آزمـایش مولکـولی:*** از ۵۴ جدایـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* اخـذ شـده از آزمایشـگاه ورم پسـتان کلینیـک دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه فردوسـی مشـهد، ۴۴ جدایـه بـا واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز جهـت ردیـابی ژن *nucA*، بـه‌عنـوان استافیلوکوکوس اورئوس مـورد تأییـد قـرار گرفـت. تمـام ۴۴ جدایـه بـا روش PCR از نظـر وجـود ژن‌هـای *mecC*، *mecB* و *mecA* مـورد آنـالیز قـرار گرفتنـد. از ۴۴ جدایـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* تعـداد یـک جدایـه واجـد ژن *mecA* شناسـایی گردیـد و در هـیچ یـک از جدایـه‌هـا ژن‌هـای *mecC*، *mecB* ردیـابی نشـد. جالـب توجـه ایـن کـه تنهـا جدایـه حـاوی ژن *mecA* در ایـن مطالعـه، در تسـت آنتـی‌بیـوگرام، حسـاس بـه سفوکسـیتین گـزارش گردیـد کـه بـا تکـرار آزمایشـات آنتی‌بیوگرام نیز نتایج مشابهی حاصل گردید.

## بحث و نتیجه‌گیری

از مجمـوع ۵۴ جدایـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* اخـذ شـده از آزمایشـگاه ورم پسـتان کلینیـک دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه فردوسـی مشـهد، ۴۴ جدایـه بـا آزمـون‌هـای بیوشـیمیایی و واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز جهـت ردیـابی ژن *nuc A*، بـه‌عنـوان *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* مـورد تأییـد قـرار گرفتنـد. تمـام ۴۴ جدایـه بـا روش PCR از نظـر وجـود ژن‌هـای *mecC* و *mecB* و *mecA* مـورد آنـالیز قـرار گرفتنـد. از ۴۴ جدایـه *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* تنهـا یـک جدایـه واجـد ژن *mecA* بـوده و در هـیچ یـک از جدایـه‌هـا، ژن‌هـای *mecC*،*mecB* ردیـابی نشـد. تنهـا جدایـه حـاوی ژن *mecA* در این مطالعـه، در تسـت آنتـی‌بیـوگرام، حسـاس بـه سفوکسـیتین گـزارش گردیـد و همچنـین بـا تکـرار آزمایشـات آنتـی‌بیـوگرام نیـز نتـایج مشـابهی حاصـل گردیـد. نتـایج حاصـل شـده بـا پـژوهش انجـام شـده توسـط خـویی و همکـاران (۲۰۱۴) کـه نشـان‌دهنـده فراوانـی بـالای MRSA اسـت در تضـاد مـی‌باشـد ولـی از نظـر عـدم همخـوانی تسـت‌هـای فنـوتیپی و ژنـوتیپی مشـابهت دارد. در پـژوهش خـویی و همکـاران، ۴۴/۴ درصـد از ایزولـه‌هـای به‌دسـت آمـده از نمونـه‌های انسـانی، در تسـت فنـوتیپی بـه‌عنـوان MRSA تشـخیص داده شـدند امـا در تسـت مولکـولی۵۳/۳ درصـد ازایزولـه‌هـا واجـد ژن *mecA* جداسـازی گردیـد (۲۶). عـدم تطـابق نتـایج روش فنـوتیپی و ژنـوتیپی در ایـن پـژوهش و پـژوهش حاضـر مـی‌توانـد بـه علـت حضـور سویه‌های هتروژنوس باشد. همچنـین بـا توجـه بـه ایـن کـه بررسـی مقاومـت پـس از تهیـه اسـتوک گلیسـرول و نگهـداری در آزمایشـگاه بـه انجـام رسـیده اسـت ممکـن اسـت ایـن جدایـه تـوان بیـان ژن *mec* را در شـرایط آزمایشـگاهی از دسـت داده باشـد کـه ایـن مسـأله

می‌تواند به‌عنوان چالش مهمی در شناسایی دقیق سویه‌های MRSA مطرح باشد.

اگرچه در پژوهش حاضر هیچ یک از جدایه‌ها، در تست فنوتیپی به سفوکستین مقاوم نبودند، اما از میان ۴۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی در ۱ (۲/۲۷ درصد) جدایه ژن *mecA* مشاهده گردید که با یافته‌های آهنگری و همکاران (۱۳۹۷) (۲۷)، سنگری‌فر و همکاران (۱۳۹۶) (۲۸)، Srednik و همکاران (۲۰۱۹) (۱۱)، که به‌ترتیب در۱/۳، ۵، ۳/۳ درصد از جدایه‌ها، ژن *mecA* را شناسایی کردند مطابقت دارد اما با نتایج برخی پژوهش‌های انجام شده در ایران و خارج از ایران همخوانی ندارد. برای مثال، در پژوهشی که توسط هوایی و همکاران (۱۳۹۵) (۲)، در شهر اهواز بر روی ۴۴ جدایه به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی انجام شد، میزان ۱۰ (۲۲/۷۲ درصد) ایزوله واجد ژن *mecA* جداسازی گردید. میزان ژن *mecA* گزارش شده در پژوهش حاضر نسبت به این پژوهش انجام شده در ایران پایین بود که می‌تواند به علت استفاده از روش‌های مدیریتی مناسب در گاوداری‌های منطقه مورد مطالعه باشد (۲۹). در مطالعه‌ی دیگری توسط Shrivastava و همکاران از ۸۵ جدایه به‌دست آمده از ورم پستان گاوی، در ۱۴ (۱۶/۴۷ درصد) ایزوله ژن *mecA* ردیابی گردید (۳). که این عدم همخوانی ممکن است به دلیل تفاوت در میزان جامعه آماری و منطقه نمونه‌گیری باشد.

MRSA حاوی *mecC* از ۱۳ کشور اروپایی و ۱۴ گونه میزبانی از سال ۱۹۷۵ تا ۲۰۱۱ و از طیف وسیعی از عفونت‌ها از جمله عفونت پوست و استخوان، پنومونی، باکتریمی کشنده در انسان و ورم پستان و کونژنکتیویت مزمن در حیوانات جدا شده است. بر اساس شواهد، ایزوله‌های MRSA حاوی *mecC* واجد چندین فاکتور حدت شناخته شده از جمله: عامل چسبندگی، سوپر آنتی‌ژن و توکسین می‌باشند. همچنین، مقاومت به غیر بتالاکتام‌ها در میان این ایزوله‌ها غیر معمول است (۳۰). در این پژوهش از ۴۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در هیچ یک از جدایه‌ها ژن *mecC* ردیابی نشد و این یافته در تطابق با نتایج تحقیقات سنگری‌فر و همکاران (۱۳۹۶) (۲۸)، دستمالچی ساعی و پناهی (۲۰۱۹) (۳۱) و Cikman و همکاران (۲۰۱۹) (۱۴) است که در این پژوهش‌ها نیز MRSA حاوی*mecC* مشاهده نشد که در این مورد عدم ردیابی این ژن در پژوهش حاضر ممکن است به علت کوچک بودن سایز نمونه‌های مورد بررسی باشد. هرچند که در مطالعه حاضر ژن *mecC* در هیچ یک از جدایه‌ها مشاهده نگردید، اما این ژن در مطالعات قبلی در دیگر کشورها با درصدهای متفاوت گزارش گردید. برای مثال Haenni و همکاران (۲۰۱۴) ،ژن *mecC* را در ۴۰ درصد از جدایه‌های MRSA به‌دست آمده از از گاو با ورم پستان مشاهده کردند (۳۲). در مطالعه‌ای که توسط Aklilu و Chia (۲۰۱۹) ، بر روی ۶۳ نمونه شیرگاو صورت گرفت در ۲۳/۸ درصد از جدایه‌ها ژن *mecC* مشاهده گردید (۳۳). مطالعات انجام شده در رابطه با ارزیابی شیوع MRSA حاوی *mecC* از میان گونه‌های میزبانی متفاوت و نقش آن در ایجاد بیماری، در انسان و حیوان گوناگون و خطر انتقال زئونوز این ایزوله، اهمیت شناسایی و ردیابی این ژن را مشخص می‌نماید (۳۰).

در پژوهش حاضر از ۴۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* در هیچ یک از جدایه‌ها ژن*mecB* ردیابی نشد که مطابق با پژوهش سولگی و همکاران (۲۰۱۹) است که از مجموع ۲۲۵ ایزوله جدا شده از نمونه انسانی، از هیچ یک از جدایه‌های نمونه‌های انسانی، ژن *mecB* جداسازی نشد (۳۴) اما Becker و همکاران در سال (۲۰۱۸) توانسته‌اند ژن *mecB* را

از نمونه سوآب بینی نمونه‌های انسانی جداسازی کنند (۱۲). طبق پژوهشMacFadyen و همکاران (۲۰۱۸)، ممکن است مخزن ژن *mecB* باکتری *میکروکوکوس کازئولا یتیکوس* باشد که عدم حضور این ژن در پژوهش حاضر می‌تواند با عدم گزارش این باکتری در نمونه‌های حاصل از ورم پستان در منطقه مرتبط باشد (۱۸).

در این پژوهش از ۴۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۵۴ و۲۳ درصد از ایزوله‌های به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی به‌ترتیب به پنی‌سیلین و سولفامتوکسازول-تری‌متوپریم مقاومت نشان دادند. در پژوهشی که توسط Youssifو همکاران (۲۰۱۹)، Akkou و همکاران، پورتقی و همکاران و صاحب خطیری و همکاران (۲۰۱۱) در شهر مشهد، تهران، روی ۱۱۱، ۴۵ و ۴۴۴ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ورم پستان تحت بالینی انجام شد، به‌ترتیب مقاومت به پنی‌سیلین ۵۶، ۸۷، ۱۰۰ و ۵۰ درصد گزارش گردید (۲۳، ۳۵، ۳۶، ۳۷). که نتایج پژوهش صاحب خطیری و همکاران و Youssif و همکاران، مشابه با نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد. اما میزان مقاومت به پنی‌سیلین گزارش شده در پژوهش حاضر کمتر از میزان گزارش شده در مطالعه پورتقی و همکاران و Akkou و همکاران است. که ممکن است به علت استفاده وسیع از پمادهای داخل پستانی در گاوداری‌ها، استفاده از دوزهای پایین‌تر از مقدار لازم، عدم کامل کردن دوره درمانی باشد (۲۹). همچنین در این پژوهش‌ها به‌ترتیب، ۸، ۲ و ۱۱/۱ درصد از ایزوله‌ها به سولفامتوکسازول–تری‌متوپریم مقاوم بودند. میزان مقاومت گزارش شده در مطالعه حاضر بالاتر از میزان گزارش شده در این پژوهش‌ها است که می‌تواند به علت استفاده بیش از حد و طولانی مدت از این آنتی‌بیوتیک در گله‌ها باشد.

در پژوهش اخیر ۷ درصد از ایزوله‌های به‌دست آمده از گاو با ورم پستان تحت بالینی به تایلوزین مقاومت نشان دادند. در پژوهش‌های بهرامی‌نیا و همکاران (۳۸) و پورتقی و همکاران (۲۰۱۶) به‌ترتیب ۴۷/۵ و ۲۸/۸ درصد از ایزوله‌ها، به تایلوزین مقاوم بودند (۲). عدم تشابه نتایج این پژوهش‌ها، با نتایج پژوهش حاضر ممکن است ناشی از تفاوت‌های مدیریتی و سیستم‌های شیردوشی باشد (۲۹). همچنین در این پژوهش تمام ۴۴ جدایه حساس به سفوکستین و انروفلوکساسین بودند. مشابه با پژوهش حاضر، در پژوهش Akkou و همکاران، پورتقی و همکاران، تمام جدایه‌ها حساس به سفوکستین و انروفلوکساسین گزارش شد. اما در پژوهش Youssif و همکاران تنها ۲۴ جدایه *استافیلوکوکوس اورئوس* (۳۷/۵ درصد) مقاوم به سفوکستین گزارش شد که این میزان بیشتر از یافته‌های ما می‌باشد که ممکن است به علت عدم انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی، استفاده وسیع از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حضور طولانی مدت گاوهای آلوده در گله باشد (۲۹).

در مطالعه صورت گرفته مشاهده شد که *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از حیوانات علاوه بر پنی‌سیلین به آنتی‌بیوتیک‌های غیر بتالاکتام هم مقاومت نشان داده است (اگرچه درصد مقاومت گزارش شده بالا نبود). درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی گزارش شده در این پژوهش، اهمیت بکارگیری استفاده محتاطانه از آنتی‌بیوتیک‌ها را در فارم‌های گاوداری مشخص می‌نماید. این مطالعه برای اولین بار در شمال شرق کشور برای تعیین MRSA حاوی *mecC* و*mecB* صورت گرفته که مشخص شد که این نوع MRSA در منطقه مورد بررسی شایع نبوده و لازم است پژوهش‌های بیشتری در این مورد انجام شود. نتایج این مطالعه همچنین می‌تواند به ما کمک کند تا با روش‌های مناسب‌تری از انتشار کلون‌های مقاوم پیشگیری کنیم.

**تشکر و قدردانی**

لازم به ذکر است که این مقاله با حمایت داشگاه فردوسی مشهد از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته باکتری‌شناسی با کد ۴۸۹۳۹ به انجام رسیده است. نگارندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی، سرکار خانم مهندس باقرزاده ابراز نموده، همچنین از آقای علی نعمتی و خانم اسدا...پور جهت بازخوانی مقاله تشکر می‌نمایند.



## References

**1- El-Tawab A, Ashraf A, El Hofy AI, Amaar AM, Sleim MA, Salem HS.** 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*. 2016; 30(1): 219-30.

**2- Abera M, Demie B, Aragaw K, Regassa F, Regassa A.** 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.* 2010; 2(3): 29-34.

**3- Shrivastava N, Sharma V, Nayak A, Shrivastava AB, Sarkhel BC, Shukla PC, *et al.*** Prevalence and Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Mastitis in Dairy Cattle in Jabalpur, Madhya Pradesh. *Journal of Animal Research*. 2017; 7(1): 77.

**4- Havaei SA, Assadbeigi B, Esfahani BN, Hoseini NS, Rezaei N, Havaei SR.** Detection of *mecA* and enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis and characterization of Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in MRSA strains. *Iranian journal of microbiology*. 2015; *7*(3): 161. [In Persian]

**5- Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K.** Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*. 2016; 12(1): 1-1.

**6- Turlej AG AT A, Hryniewic W A L E R I A, Empel J.** *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* (Sccmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol*. 2011; *60*(2): 95-103.

**7- Devries LA, VanDamme LR, Fameree L.** Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt* für *Veterinärmedizin Reihe B* .1972; *19*(7): 598-605.

**8- Devriese LA, Hommez J.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. *Research in veterinary science*. 1975; *19*(1): 23-27.

**9- Paul I, Isore DP, Joardar SN, Mukhopadhayay SK, Jana C, Ganguly S.** Investigation on methicillin resistant gene of *Staphylococcus aureus* for causing bovine mastitis. *Indian J Comp Microbiol Immunol. Infect Dis*. 2015; *36*(1): 35-8.

**10- Bardiau M, Yamazaki K, Duprez JN, Taminiau B, Mainil JG, Ote I.** Genotypic and phenotypi ccharacterization of methicillin - resist *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Letters in Applied Microbiology*. 2013; 57(3): 181-6.

**11- Srednik ME, Crespi E, Testorelli MF, Puigdevall T, Pereyra AM, Rumi MV, *et al.*** First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. *Veterinary and Animal Science*. 2019; 7: 100043.

**12- Becker K, van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, Seggewiß J, Mellmann A, *et al.*** Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*. 2018; 24(2): 242.

**13- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, *et al.*** Meticillin-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*. 2011; 11(8): 595-603.

**14- Cikman A, Aydin M, Gulhan B, Karakecili F, Kurtoglu MG, Yuksekkaya S, *et al.*** 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*. 2019; Feb 7.

**15- Turlej AGATA, Hryniewicz WALERIA, Empel J.** *Staphylococcal* cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods:an overview. *Pol J Microbiol.* 2011; *60*(2): 95-103.

**16- Juuti K.** Surface protein Pls of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-role in adhesion, invasion and pathogenesis, and evolutionary aspects. 2004.

**17- Peacock S J, Paterson G K.** Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual review of biochemistry*. 2015; *84*: 577-601.

**18- Macfadyen AC, Fisher EA, Costa B, Cullen C, Paterson GK.** Genome analysis of methicillin resistance in *Macrococcus caselyticus* from dairy cattle in England and Wales. *Microbial genomics*. 2018; 4(8).

**19- Chambers HF**. Methicillin-resistant *staphylococci*. Clinical microbiology reviews. 1988; 1(2): 173-86

**20- Dweba CC, Zishiri OT, El Zowalaty ME.** Isolation and Molecular Identification of Virulence, Antimicrobial and Heavy Metal Resistance Genes in Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*. 2019; 8(2):79.

**21- Misiura A, Pigli YZ, Boyle‐Vavra S, Daum RS, Boocock MR, Rice PA.** Roles of two large serine recombinases in mobilizing the methicillin-resistance cassette SCCmec. *Molecular microbiology*. 2013; 88(6): 1218-29.

**22- Kim SH, Jeong HS, Kim YH, Song SA, Lee JY, Oh SH, *et al*.** Evaluation of DNA extraction methods and their clinical application for direct detection of causative bacteria in continuous ambulatory peritoneal dialysis culture fluids from patients with peritonitis by using broad-range PCR. *Annals of laboratory medicine*. 2012; 32(2): 119-25.

**23- Shebekhtiari N, Nochi Z, Eslampour M, Dabiri M, Bolifion M, Teherikalani M, *et al*.** Characterization of *staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiologica et immunologica Hungarica.* 2011; 58(2): 113-21.

**24- Ishihara k, Shimokubo N, Sakagami A, Ueno H, Muramatsu Y, Kadosawa T, *et al*.** Occurrence and Molecular Characteristics Of Methicillin-Resistant *staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. *Applied and environmental microbiology*. 2010; 76 (15): 5165-74.

**25- CaLSI CL.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Approved Twenty: Document M100-S28. Wayne, PA, USA: CLSI.2018; 2018 -19

**26- Khoei F, Mobaiyen H, Nahaei MR, Sedeghi Mohammadi S.** Antibiotic resistance pattern and Frequency of *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* isolated from shohada hospital, Tabriz. *Journal of medical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014; 2(3): 105-8. [In Persian]

**27- Ahangari Z, Ghorbanpoor M, Shapouri MR, Gharibi D, Ghazvini K.** Methicillin resistance and selective genetic determinants of *Staphylococcus aureus* isolates with bovine mastitis milk origin. *Iranian journal of microbiology*. 2017; 9(3): 152.

**28- Sangarifar Samira, Hassan Ghajavand, Behrooz Johari, and Abazar Yari.** Frequency of *clf-A*, *mecA*, and *mecC* Genes in *Staphylococcus Aureus* Strain isolated From Nosocomial Infections and Cows Milk. 2016; 233-238.

**29- Hashemi M.** Prevalence of antibiotic resistance among bacterial pathogens isolated from dairy cows with mastitis in Far province. *Veterinary Researches & Biological Products*. 2016; 29(3): 85-93. [In Persian]

**30- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA.** The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*. 2014; 22(1): 42-7.

**31- Dastmalchi HS, Panahi M.** 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*. 2019; Sep.

**32- Haenni M, Châtre P, Tasse J, Nowak N, Bes M, Madec JY, *et al*.** Geographical clustering of *mecC*-positive *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014; *69*(8): 2292-2293.

**33- Aklilu E, Chia HY.** First *mecC* and *mecA* positive livestock-associated methicillin resistant *Staphylococcu saureus* (*mecC* MRSA/LA-MRSA) from dairy cattle in Malaysia. Microorganisms. 2020; 8(2): 147.

**34- Solgi S, Razavi S, Nateghian A, Irajian G, Pournajaf A, Haasnnejad-Bibalan M, *et al*.** Resistance-related determinants in clinically relevant *Staphylococcus aureus* isolated from teaching therapeutic centers, Tehran, Iran. *Reviews in Medical Microbiology*. 2019; May 31. [In Persian]

**35- Youssif NH, Hafiz NM, Halawa MA, Aziz HM.** Genes conferring antimicrobial resistance in cattle with Subclinical mastitis. *Bulgarian J Vet Med*, DOI. 2019; 10: 2019-0028.

**36- Akkou M, Antri K, Bachtarzi MA, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, *et al*.** Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and na-

sal carriage of workers in contact to animals in Algeria. *Pak. Vet. J*. 2016; 36(2): 184-8.

**37- Pourtaghi H, Aziz AG, Sodagari H.** Antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Alborz province, Iran. *Bulg J vet Med*. 2016; 19(2): 169-74

**38- Bahraminia F, Emadi SR, Emaneini M, Farzaneh N, Rad M, Khoramian B.** Ahigh prevalence of tylosin resistance among *staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *In Veterinary Research Forum*. 2017; 8(2): 121. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. [In Persian]

# Investigation of the presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carrying different *mec* types in isolates causing bovine subclinical mastitis

**Mehri Amini Kamroodi[1], Gholamreza Hashemitabar[2], Mahdi Askari Badouei[*3], Babak Khoramian[4], Hamide Kalate Rahmani[5]**

1 - Master of bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2 - PhD, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3 - PhD, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4 - DVSc, Department of Clinical Sciences, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
5 - PhD, Department of Pathobiology, Faculty of veterinary, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Receive: March 7, 2022; Revise: April 7, 2022; Accept: April 24, 2022

## Summary

*Staphylococcus aureus* is one of the most important agents causing mastitis in dairy cattle. The emergence of methicillin resistance in *S. aureus* is a concern in veterinary medicine and public health. Due to the identification of new types of genes encoding methicillin resistance in recent years, the aim of this study was to investigate the presence of methicillin resistant (MRSA) and types of *mec* gene for the first time in the northeast of Iran. In the present study, the identity of 54 *staphylococcus aureus* isolates causing bovine subclinical mastitis was investigated using biochemical and molecular tests. Among them, the species-specific *nuc* gene was detected in 44 strains. Then, resistance of isolates to penicillin, cefoxitin, enrofloxacin, tylosin, and trimethoprim-sulfamethoxazole were determined using the disk diffusion method. Finally, the molecular investigations for detection of the *mecA, mecC, mecB* genes were conducted. According to the results, the highest resistance were related to penicillin (54%) and trimethoprim-sulfamethoxazole (23%), and the lowest resistance was related to taylosin (7%). The *mecA* gene was observed in only one isolate (2.3%), while the isolate was not identified as MRSA in phenotypic test. The results of the present study show that the incidence of methicillin resistance in bovine mastitis strains of the area is not high. This study also showed that less known types of *mec* genes were not common in this region. However, further studies must be conducted in this regard.

***Keywords:*** *Staphylococcus aureus, mec, subclinical mastitis*