University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 79, Number 2, 2024, 101-110

Frequency of Resistance to β-Lactam Antibiotics and the Presence of β-Lactamase-Producing Genes *bla$_{SHV}$* and *bla$_{TEM}$* in *Escherichia coli* Isolates from Bovine Clinical Mastitis in Tabriz City, Iran

Samira Vahabian[1]✉, Mehdi Ghiamirad[2]✉, Ahmad Babazadeh Badoustani[3]✉

[1] *Graduated from the Rabe Rashid Institute of Higher Education, Tabriz, Iran*
[2] *Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran*
[3] *Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran; Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran*

Received: *10 January 2024****, Accepted:*** *13 March 2024*

10.22059/jvr.2024.364660.3391

Abstract

BACKGROUND: Mastitis is known as the most economic important disease in the dairy industry in the world. *Escherichia coli* (*E. coli*) is one of the major causes of mastitis, which is treated with antibiotics, especially β-lactams. The emergence and spread of resistance to these antibiotics in livestock and the potential transfer of this resistance to human communities is a serious threat to public health in different countries.

OBJECTIVES: This study aimed to determine the resistance to β-lactams in *E. coli* isolates from the milk samples of bovine clinical mastitis in Tabriz City, Iran. Also, the presence of the extended-spectrum β-Lactamase (ESBL)-encoding genes (*bla*$_{TEM-1}$ and *bla*$_{SHV-1}$) was investigated in the isolates.

METHODS: In this descriptive cross-sectional study, 240 milk samples were collected from cattle with clinical mastitis in Tabriz. None of the cattle were under antibiotic therapy before sampling. The samples were evaluated according to the standard microbiological methods. The antibiotic susceptibility of *E. coli* isolates was investigated using the disk diffusion method. Also, the isolates were evaluated for the production of ESBL using the combined disk test. Finally, the presence of *bla*$_{TEM}$ and b*la*$_{SHV}$ in β-lactamase producing strains was confirmed using the PCR method.

RESULTS: Out of 240 samples, *E. coli* was isolated from 50 samples (20.83%), of which 22 isolates (44%) were detected as β-lactamase producers. The results of the PCR test showed that seven isolates (31.81 %) carried the *bla*$_{TEM}$ and four (18.18 %) the *bla*$_{SHV}$.

CONCLUSIONS: Considering the abundance of β-lactamase-producing *E. coli* in this study, there is a possibility of the spread of antibiotic resistance among the livestock population due to improper use of antibiotics and transferring resistance genes to human communities. Therefore, accurate identification, proper treatment of infected animals, and compliance with the withdrawal period of animal products treated with antibiotics are recommended.

Keywords: Bovine mastitis, *Escherichia coli*, Extended-spectrum β-lactamases, *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Mehdi Ghiamirad, Tel/Fax: +9841-35422864/ +9841-44239123

How to cite this article:

Vahabian S, Ghiamirad M, Babazadeh Badoustani A. Frequency of Resistance to β-Lactam Antibiotics and the Presence of β-Lactamase-Producing Genes *blaSHV* and *blaTEM* in *Escherichia coli* Isolates from Bovine Clinical Mastitis in Tabriz City, J Vet Res, 2024; 79(2): 101-110. doi: 10.22059/jvr.2024.364660.3391

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequence of primers used for *bla*$_{TEM}$ and *bla*$_{SHV}$ genes amplification.

Figure 1. Phenotypic examination of the presence of β-lactamases. The left disks contain clavulanic acid, and the right disks contain the same antibiotics as those without clavulanic acid.

Figure 2. Results of *bla*$_{TEM}$ electrophoresis in the studied isolates.The first well: 1500 pb marker, second well: negative control, third well: positive control, fourth to seventh wells: positive samples (1119 bp).

Figure 3. The results of *bla$_{SHV}$* gene electrophoresis in the studied isolates. The first well: 1500 bp marker, second well: negative control, third well 3:, positive control, fourth to seventh wells: positive samples (865 bp).

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی
دوره ۷۹، شماره ۲، ۱۴۰۳، ۱۱۰-۱۰۱

فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حضور ژن‌های مولد بتالاکتاماز bla_{SHV} و bla_{TEM} در *اشرشیاکلی*‌های جداشده از موارد ورم پستان بالینی گاو در تبریز

سمیرا وهابیان[۱]، مهدی قیامی‌راد[۲]، احمد بابازاده بدوستانی[۳]

[۱] *دانش آموخته موسسه آموزش عالی ربع رشید تبریز، تبریز، ایران*
[۲] *گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران*
[۳] *مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۰ دی ماه ۱۴۰۲ ، **تاریخ پذیرش:** ۲۳ اسفند ماه ۱۴۰۲

10.22059/jvr.2024.364660.3391

چکیده

زمینه مطالعه: ورم پستان اقتصادی‌ترین بیماری تهدیدکننده صنعت پرورش گاو شیری در جهان می‌باشد. *اشرشیاکلی* ازجمله عوامل ایجادکننده ورم پستان است که برای درمان آن از آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده می‌شود. ظهور و گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جوامع دامی و احتمال انتقال این مقاومت به جوامع انسانی به‌عنوان تهدیدی جدی برای سلامت عمومی در جوامع مختلف می‌باشد.

هدف: مطالعه حاضر باهدف تعیین فراوانی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حضور ژن‌های مولد بتالاکتامازی bla_{TEM} و bla_{SHV} در جدایه‌های *اشرشیاکلی* جمع‌آوری‌شده از موارد ورم پستان بالینی گاو در شهر تبریز انجام شد.

روش‌کار: در مطالعه توصیفی‌مقطعی حاضر، ۲۴۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی در شهرستان تبریز جمع‌آوری شدند. پیش از نمونه‌برداری هیچ‌کدام از گاوهای مذکور، درمان آنتی‌بیوتیک نداشتند. نمونه‌ها براساس روش‌های استاندارد میکروبیولوژی تعیین هویت شدند. حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک بررسی شد. تست تأییدی مولدین بتالاکتاماز به روش دیسک ترکیبی انجام شد. درنهایت حضور ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} در جدایه‌های مولد بتالاکتاماز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی گردید.

نتایج: از ۵۰ مورد از نمونه‌های موردبررسی (۲۰/۸۳ درصد) *اشرشیاکلی* جداسازی شد که از این تعداد، ۲۲ نمونه (۴۴ درصد) مولد بتالاکتاماز بودند. نتایج بررسی مولکولی نشان داد ۷ نمونه (۳۱/۸۱ درصد) حامل ژن bla_{TEM} و ۴ نمونه (۱۸/۱۸ درصد) حامل ژن bla_{SHV} بودند.

نتیجه‌گیری نهایی: باتوجه‌به فراوانی *اشرشیاکلی* مولد بتالاکتاماز در مطالعه حاضر، احتمال گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جمعیت دامی به‌دلیل مصرف غیراصولی آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین احتمال انتقال ژن‌های مقاومت به جوامع انسانی، شناسایی و درمان صحیح دام‌های مبتلا و رعایت دوره منع مصرف محصولات دام‌های تحت درمان با آنتی‌بیوتیک توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: *اشرشیاکلی*، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، ورم پستان گاو، bla_{TEM}، bla_{SHV}

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *مهدی قیامی‌راد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران*

مقدمه

ورم پستان به التهاب غده پستانی بدون توجه به‌علت آن اطلاق می‌شود که به‌وسیله تغییرات فیزیکی و شیمیایی شیر و تغییرات در بافت غده پستانی مشخص می‌شود (۱). این بیماری مهم‌ترین چالش پیش‌روی صنعت پرورش گاو شیری است و خسارات اقتصادی فراوانی را به گاوداری‌ها و صنعت تولید لبنیات وارد می‌کند. ازجمله این خسارات کاهش تولید و افت کیفیت شیر، هزینه‌های دارو و دامپزشکی، هزینه اتلاف منابع مثل حذف یا حتی مرگ احتمالی دام، حذف شیر در دوره بیماری و درمان و تأثیر نامطلوب بر باروری حیوان را می‌توان نام برد (۲، ۳). عفونت پستان به‌وسیله انواع باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها ایجاد می‌شود و به سه فرم بدون علامت، ورم پستان بالینی (حاد

و مزمن) و تحت بالینی دیده می‌شود (۳، ۴) باکتری‌های اصلی ایجادکننده ورم پستان به ۲ دسته عوامل واگیردار، شامل *استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus aureus)*، *استرپتوکوکس آگالاکتیه(Streptococcus agalactia)*، *کورینه باکتریوم بویس (Corynebacterium bovis)*، *مایکوپلاسما بویس (Mycoplasma bovis)* و محیطی شامل *اشرشیاکلی (Escherichia coli)*، *استرپتوکوکس دیس گالاکتیه(Streptococcus dysgalactia)* و *استرپتوکوکس یوبریس (Streptococcus uberis)* تقسیم‌بندی می‌شوند (۵-۷). از سایر عوامل باکتریایی ایجادکننده ورم پستان می‌توان به *سودوموناس آئروجینوزا (Pseudomonas aeruginosa)*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (Staphylococcus epidermidis)*، *کلبسیلا پنومونیه(Klebsiella pneumoniae)*، *کلبسیلا اکسی‌توکا(Klebsiella oxytoca)*، *کلبسیلا آئروجنز (Klebsiella aerogenus)*، گونه‌های پاستورلا (Pasteurell spp) و پروتئوس (Proteus) اشاره کرد (۸، ۹).

اشرشیاکلی (E.coli) باکتری گرم منفی، از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌صورت فرصت‌طلب باعث ورم پستان تحت بالینی و بالینی گاوها می‌شود (۳). برای درمان ورم پستان، پس از شناسایی میکروارگانیسم مولد آن باید آنتی‌بیوتیک مناسب تجویز شود. آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام ازجمله داروهای موردمصرف در درمان ورم پستان ناشی از *اشرشیاکلی* می‌باشند. این آنتی‌بیوتیک‌ها در ساختار مولکولی خود حلقه بتالاکتام داشته و با اثر بر دیواره سلولی باکتری باعث نابودی آن می‌شوند (۱۰، ۱۱). استراتژی‌های مختلفی توسط باکتری‌ها برای مصون ماندن از اثرات زیان‌بار این داروها به کار گرفته می‌شود. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌ها در باکتری‌های گرم منفی خصوصاً *اشرشیاکلی* علیه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی است که ازطریق هیدرولیز حلقه بتالاکتام به ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها منجر می‌شوند. استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نسل جدید در درمان بیماری‌های عفونی باکتریایی به بروز دسته جدید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (Extended-Spectrum β-Lactamase) منجر شده است (۱۲، ۱۳). آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBLs) نخستین‌بار در اواسط دهه ۱۹۸۰ در غرب اروپا و از باکتری کلبسیلا جداسازی شدند. سپس در دیگر گونه‌های انتروباکتریاسه یافت شد. ژن تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف بر روی پلاسمید واقع می‌شود و مقاومت متقاطع نسبت به کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها را ممکن می‌کند. براساس عملکرد آنزیم‌های بتالاکتامازی در چهار کلاس اصلی A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند. براساس این طبقه‌بندی، آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در گروه A قرار گرفته‌اند (۱۴).

اولین بتالاکتاماز پلاسمیدی در سال ۱۹۶۵ در یونان از کشت خونی فردی به نام Termoneria در شهر آتن کشف و به نام *bla $_{TEM1}$* نام‌گذاری شد. اندکی بعد آنزیمی نزدیک به آن کشف و نام *TEM2* بر آن گذاشته شد که علی‌رغم خصوصیات بیوشیمیایی یکسان در یک اسیدآمینه تفاوت داشتند که باعث تفاوت در نقطه ایزوالکتریک دو آنزیم می‌شد. TEM1 و TEM2 پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های طیف باریک مثل سفالوتین یا سفازولین را هیدرولیز می‌کنند، اما در برابر سفالوسپورین‌های نسل بالاتر با زنجیره جانبی اکسی ایمینو مثل سفوتاکسیم مؤثر نمی‌باشند (۱۵، ۱۶).

Bla $_{SHV1}$ اولین آنزیم از گروه SHV می‌باشد که در سال ۱۹۷۲ توسط پیتون Piton کشف و ابتدا PIT2 نام گرفت (۱۷). این ژن احتمالاً از یک پنی‌سیلیناز کروموزومی در *کلبسیلا پنومونیه* منشأ گرفته است، اما چگونگی انتقال آن از کروموزوم به پلاسمید هنوز توجیه قانع‌کننده‌ای ندارد (۱۸). بتالاکتامازهای SHV براساس ویژگی مولکولی یا عملکردی به ۳ زیرگروه تقسیم می‌شوند: 2b که قادر به هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های نسل ۱ و ۲ می‌باشند و توسط کلاولونیک اسید مهار می‌شوند، 2br که بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف و در برابر اسید کلاولونیک مقاوم می‌باشند و 2be که شامل ESBL هایی می‌باشند که می‌توانند اکسی ایمنوبتالاکتام‌ها مثل آزترونام را هم هیدرولیز کنند. البته اکثر تیپ‌های SHV به‌دلیل عدم شناسایی کامل خصوصیات بیوشیمیایی هنوز طبقه‌بندی نشده‌اند (۱۵). *bla$_{SHV1}$* جزء گروه 2b از خانواده SHV محسوب می‌شود (۱۷). مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام و حضور ژن‌های بتالاکتامازی *bla $_{TEM}$* و *bla $_{SHV}$* در جدایه‌های *اشرشیاکلی* جمع‌آوری‌شده از موارد ورم پستان گاوی در شهرستان تبریز انجام شد.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری و جداسازی عوامل ایجادکننده ورم پستان: در مطالعه توصیفی‌مقطعی حاضر ۲۴۰ نمونه شیر، طی دوره یک‌ساله، به‌صورت تصادفی از گاوهای دارای علائم ورم پستان بالینی، شامل تغییرات در قوام و رنگ شیر، حضور لخته، همچنین تغییرات پاتولوژیک

شامل تورم، درد و قرمزی در غده پستان و همچنین تغییرات سیستمیک مثل بی‌اشتهایی، تب در گاوداری‌های صنعتی شهرستان تبریز تحت شرایط استریل و طبق روش استاندارد، از کارتیه‌های مبتلا جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند (۳، ۱۹). دام‌های موردبررسی و نمونه‌برداری همه از نژاد هولشتاین بودند که به‌صورت نیمه‌باز با بستر کلش و سیستم تغذیه‌ای مخلوط TMR پرورش می‌یافتند. نمونه از دام‌های دوشا اخذ شد و هیچ‌کدام از گاوهای مذکور قبل از نمونه‌برداری، درمان آنتی‌بیوتیکی دریافت نکرده بودند.

تعیین هویت باکتری‌های جداشده: برای شناسایی عوامل ایجادکننده عفونت از آزمایشات توصیه‌شده در منابع معتبر میکروبیولوژی و کشت در محیط‌های استاندارد استفاده شد. جهت جداسازی و شناسایی *اشرشیاکلی* از سایر باکتری‌ها، از کشت در محیط‌های افتراقی و اختصاصی مرسوم مانند مک کانکی آگار، EMB، TSI، SIM، اوره آگار، ژلاتین، سیمون سیترات، MR_VP (مرک آلمان) و آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات و تخمیر قندها استفاده شد (۱۹).

تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها: جهت تعیین الگوی مقاومت و حساسیت ایزوله‌ها، از روش دیسک دیفیوژن (کربی بائر) استفاده شد. جهت این کار دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، جنتامایسن (۱۰ میکروگرم)، کوتریماکسازول (۲ میکروگرم)، سفکسیم (۵ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازدیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفتی زوکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، نالدیسیک اسید (۳۰ میکروگرم) و ایمی پنم (۱۰ میکروگرم) ساخت شرکت Hi media (India) طبق روش توصیه‌شده توسط CLSI استفاده شد (۲۰).

آزمون فنوتیپی تأیید تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسط جدایه‌ها: تأیید مولدین ESBL در باکتری‌های جداشده، براساس آزمون دیسک ترکیبی انجام شد. در این روش از دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) و سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) همراه با دیسک ترکیبی آن‌ها سفتازیدیم/کلاولونیک اسید (۳۰ میکروگرم/۱۰ میکروگرم) و سوفتاکسیم / کلاولونیک اسید (۳۰ میکروگرم / ۱۰ میکروگرم) ساخت شرکت Himedia (India) استفاده شد. به این منظور سوسپانسیونی معادل نیم مک‌فارلند از جدایه موردبررسی تهیه و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌ها به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاولونیک اسید نسبت به هاله عدم رشد در اطراف دیسک بدون کلاولونیک اسید از همان آنتی‌بیوتیک سنجیده شد. در مواردی که قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک ترکیبی ≥۵ میلی‌متر بیشتر از قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک تکی همان آنتی‌بیوتیک بود، سویه موردنظر، طبق ضوابط CLSI به‌عنوان سویه بتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته شد (۲۰).

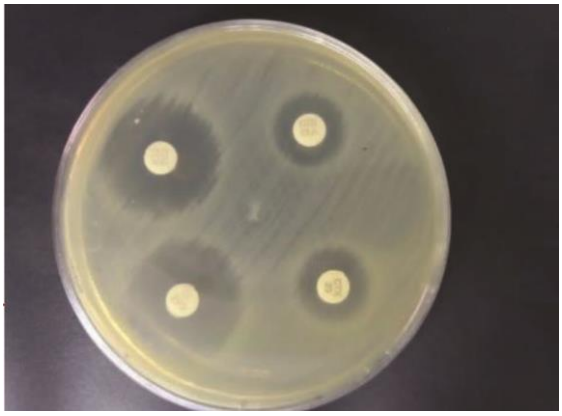
استخراج DNA و انجام آزمایش زنجیره‌ای پلیمراز PCR: استخراج DNA به روش جوشاندن (Boiling) انجام شد. سنجش غلظت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Thermo USA) انجام شد. در یک DNA خالص، نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ آنگستروم به ۲۸۰ آنگستروم برابر ۱/۸ الی ۲ بود.

برای انجام PCR جهت شناسایی ژن بتالاکتامازی *TEM* از یک جفت پرایمر اختصاصی با طول محصول ۱۱۱۹ جفت بازی و جهت شناسایی ژن بتالاکتامازی *SHV* از یک جفت پرایمر اختصاصی با طول محصول ۸۶۵ جفت بازی ساخت شرکت سینا کلون استفاده شد (جدول ۱). توالی پرایمرهای مورداستفاده و طول باند تکثیری با استفاده از برنامه Primer Blast مورد تأیید قرار گرفت.

واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر برای هر واکنش با ترکیب بافر ۱۰X، ۲/۷ میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر از DNA الگو، مخلوط dNTPs ۰/۵۴ میکرولیتر، $Mgcl_2$ ۰/۸ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، آنزیم Taq ۰/۳ میکرولیتر، آب دیونیزه ۱۱/۶ میکرولیتر انجام شد. این واکنش تحت برنامه زمانی، شامل یک سیکل ۳ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت اولیه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۳۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد واسرشت‌سازی ثانویه، ۳۰ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد اتصال، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد طویل شدن و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای طویل شدن نهایی برای ژن *TEM* و برای ژن *SHV* شامل یک سیکل ۴ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت اولیه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت‌سازی، ۱ دقیقه در ۵۱ درجه سانتی‌گراد اتصال، ۱۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد طویل شدن و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌منظور طویل شدن نهایی با دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) صورت گرفت.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورداستفاده جهت تکثیر ژن‌های *bla TEM* و *blaSHV*

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)	رفرانس
TEM/F TEM/R	5′-GGGGAGCTCATAAAATTCTTGAAGAC-3′ 5′-GGGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA-3′	1119bp	۱۶
SHV/F SHV/R	5′-TGGTTATGCGTTATATTCGCC-3′ 5′-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3′	865bp	۱۷



تصویر ۱. بررسی فنوتیپی حضور بتالاکتامازها، دیسک‌های سمت چپ حاوی کلاولونیک اسید و دیسک‌های سمت راست همان آنتی‌بیوتیک‌ها بدون کلاولونیک اسید می‌باشند.

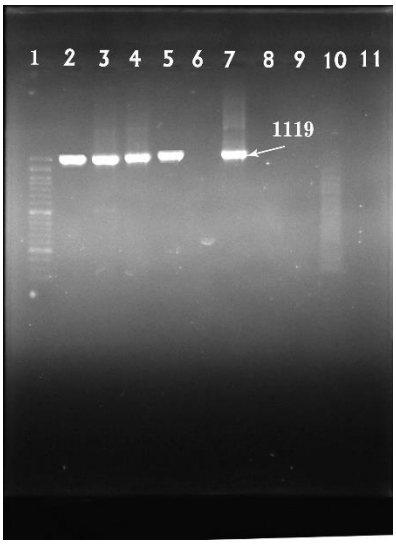
در مطالعه حاضر از سویه *Klebsiella pneumonia ATCC 700603* به‌عنوان سویه کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد در ولتاژ ۱۰۰ ولت و به‌مدت ۳۰ دقیقه در کنار ۱۰۰bp DNA ladder انجام شد و پس از رنگ‌آمیزی با DNA safe stain با استفاده از دستگاه ژل داکومنتیشن، زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفت. حضور باندهای قوی در مناطق ۱۱۱۹ و ۸۶۵ جفت بازی مارکر نشان‌دهنده تکثیر قطعه موردنظر و نهایتاً وجود ژن مولد بتالاکتاماز *TEM* و *SHV* در جدایه باکتری موردنظر بود.

تحلیل آماری: تحلیل آماری متغیرهای تحت بررسی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون آماری مربع کای (Chi-Square) در سطح معنی‌داری $P\geq$۰/۰۵ انجام شد.

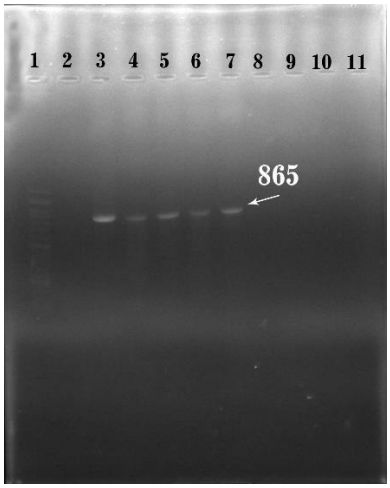
نتایج

از ۲۴۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، در ۵۰ نمونه (۲۰/۸۳ درصد) جدایه *اشرشیاکلی* شناسایی شد. در بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، بیشترین مقاومت به‌ترتیب مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های سفتازیدیم (۹۸ درصد)، سفتی زوکسیم (۹۰ درصد) سفوتاکسیم و آمپی‌سیلین (۸۸ درصد) و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریماکسازول (۱۰۰ درصد) و جنتامایسن (۹۳ درصد) بود. در بررسی فنوتیپی از ۵۰ جدایه موردمطالعه، ۲۲ جدایه (۴۴ درصد) مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف بودند (تصویر ۱).

نتایج بررسی مولکولی: براساس نتایج به‌دست‌آمده از PCR، نمونه‌های مولد ESBL، ۷ جدایه (۳۱/۸۱ درصد) حامل ژن *blaTEM* (تصویر ۲) و ۴ جدایه (۱۸/۱۸ درصد) حامل ژن *blaSHV* (تصویر ۳) بودند. در هیچ‌یک از جدایه‌های مولد ESBL، دو ژن مذکور به‌طور هم‌زمان مشاهده نشدند.



تصویر ۲. نتایج الکتروفورز ژن bla_{TEM} در جدایه‌های موردمطالعه چاهک اول مارکر pb۱۵۰۰، چاهک دوم کنترل منفی، چاهک سوم کنترل مثبت چاهک‌های ۴ و ۷ نمونه‌های مثبت ۱۱۱۹ با طول باند جفت باز.



تصویر ۳. نتایج الکتروفورز ژن bla_{SHV} در جدایه‌های موردمطالعه چاهک اول مارکر ۱۵۰۰ bp، چاهک دوم کنترل منفی، چاهک ۳ کنترل مثبت، چاهک‌های ۴ تا ۷ نمونه‌های مثبت ۸۶۵ جفت باز.

بحث

اشرشیاکلی ازجمله عوامل ایجادکننده ورم پستان، اقتصادی‌ترین بیماری تهدیدکننده صنعت پرورش گاو شیری می‌باشد. مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌خصوص آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام از مشکلات عمده در درمان ورم پستان است. تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت ضدمیکروبی علیه آنتی‌بیوتیک‌های این خانواده محسوب می‌شود.

در مطالعه حاضر *اشرشیاکلی* با ۲۱/۸۳ درصد جداسازی اصلی‌ترین عامل ایجاد ورم پستان تشخیص داده شد. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه Mohammadsadegh و همکاران در سال ۲۰۱۲ در گرمسار (۲۱)، مطالعه Saleki در سال ۲۰۱۳ در ایلام (۲۲)، مطالعات Maliinowski در مجارستان در سال ۲۰۰۷ و Mahantesh در سال ۲۰۱۱ در هندوستان (۲۳، ۲۴) که در آن‌ها *اشرشیاکلی* فلور غالب ایجادکننده ورم پستان گزارش شده بود، همخوانی دارد، درحالی‌که در برخی مطالعات باکتری غالب ایجادکننده ورم پستان با نتایج مطالعه حاضر مغایر بود، به‌عنوان مثال در مطالعه Firouzi و همکاران در سال ۲۰۱۰ در شیراز *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* به‌عنوان مسبب اصلی ورم پستان بالینی گزارش شد (۲۵). در مطالعه انجام‌شده توسط Mbindyo و همکاران در سال ۲۰۲۰ در کنیا، استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی و گونه‌های استرپتوکوکوس بیشترین نقش را در ایجاد ورم پستان داشتند

(۲۶). Phuetkes و همکاران طی انجام مطالعات مختلف، در سال ۲۰۰۳ جهت شناسایی باکتری‌های مولد ورم پستان، بیشترین نرخ آلودگی را مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس یوبریس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* گزارش کرده‌اند (۲۷).

الگوی متفاوت باکتری‌های جداشده از موارد ورم پستان می‌تواند ناشی از تفاوت در حجم نمونه، دوره شیرواری (خشک یا دوشا)، حساسیت نژادی گاوهای تحت مطالعه (در مطالعه حاضر تمام نمونه‌ها از گاوهای هولشتاین اصیل جداسازی شده بودند)، نحوه پرورش و شیردوشی در دام‌ها (سنتی یا صنعتی)، بهداشت دامداری‌های تحت مطالعه، نوع ورم پستان موردمطالعه (بالینی یا تحت بالینی) و میزان تولید دام‌ها باشد. بالا بودن میزان جداسازی *اشرشیاکلی* در مطالعه حاضر را می‌توان با بهداشت نامناسب هنگام شیردوشی و بالا بودن آلودگی بستر نیز در ارتباط دانست.

ظهور و گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها از معضلات مهم بهداشتی در سراسر جهان می‌باشد که احتمال دارد در اثر تماس با دام‌های آلوده یا مصرف فراورده‌های حیوانات تحت درمان، به جوامع انسانی گسترش یابد و مشکلات عدیده را در درمان عفونت‌های میکروبی انسان به وجود آورند. در مطالعات انجام‌شده در مناطق مختلف جهان، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوتی در جدایه‌های گزارش‌شده است که برخی از آن‌ها با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت داشته و برخی متفاوت است.

در مطالعه حاضر بیشترین حساسیت جدایه‌های موردمطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول ۱۰۰ و جنتامایسین ۹۳ درصد بود. در مطالعه Mohammadsadegh و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی *اشرشیاکلی*‌های جداشده از موارد ورم پستان گاو، بیشترین حساسیت به جنتامایسین با ۹۲ درصد گزارش شد. در مطالعه یادشده حساسیت به کوتریماکسازول را ۸۰ درصد اعلام کردند (۲۱). در بررسی Sumathi و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیشترین حساسیت به جنتامایسین و بیشترین مقاومت به سولفادیازین و استرپتومایسین گزارش شد (۲۸). در مطالعه Lehtolainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ در فنلاند، بیشترین حساسیت نسبت به جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین گزارش شد. در این مطالعه میزان مقاومت بسیار کمتر از مطالعه حاضر و مطالعات مشابه بود (۲۹). در مطالعه مشابهی در بنگلادش بیشترین حساسیت به جنتامایسین و کمترین حساسیت به آموکسی‌سیلین گزارش شده است (۳۰). اختلافات مشاهده‌شده در میزان مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه را می‌توان با الگوی متفاوت مصرف آنتی‌بیوتیک در درمان ورم پستان در مناطق مختلف، مصرف خودسرانه دارو در سطح دامداری‌های منطقه، سطح بهداشتی دام‌پروری‌ها، کیفیت دیسک‌های مورداستفاده در مطالعه، روش بررسی مقاومت و دریافت آنتی‌بیوتیک قبل از نمونه‌برداری در ارتباط دانست.

در مطالعه حاضر، ۲۲ جدایه *اشرشیاکلی* (۴۴ درصد) با استفاده از آزمون دیسک ترکیبی، ESBL مثبت تشخیص داده شدند. در مطالعه Locatelli در ایتالیا در سال ۲۰۰۹ بر روی جدایه‌های *اشرشیاکلی* ایجادکننده ورم پستان این مقدار ۲۲/۷۲ درصد، در مطالعه Dahmen و همکاران (فرانسه) در سال ۲۰۱۳ (۰/۴ درصد) و در مطالعه Yang و همکاران در سال ۲۰۱۸ در چین ۲۲/۹۶ درصد گزارش شده است (۳۱-۳۳).

در مطالعه حاضر از ۲۲ جدایه ESBL مثبت *اشرشیاکلی*، ۷ جدایه (۳۱/۸ درصد) حامل ژن bla_{TEM} و ۴ جدایه (۱۸/۱۸ درصد) حامل ژن bla_{SHV} بودند. در هیچ‌کدام از جدایه‌ها این دو ژن به‌صورت هم‌زمان حضور نداشتند. در مطالعه حاضر در هیچ‌کدام از جدایه‌هایی که با روش فنوتیپی غیر ESBL تشخیص داده شده بودند، ژن‌های موردمطالعه یافت نشدند. در مطالعه Yang و همکاران در سال ۲۰۱۸، ۷۱/۲۲ درصد جدایه‌های ESBL مثبت *اشرشیاکلی* ایزوله‌شده از موارد ورم پستان واجد ژن bla_{TEM-1} بودند (۳۳). در مطالعه Bag و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی *اشرشیاکلی*‌های جداشده از موارد ورم پستان ژن bal_{TEM} در ۳۳/۸۸ درصد جدایه‌ها مشاهده شد، اما ژن bla_{SHV-1} در هیچ‌کدام از جدایه‌ها حضور نداشت (۳۰). در مطالعه‌ای در مصر که Ahmed و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، ۲۲/۲۲ درصد از جدایه‌های *اشرشیاکلی* ESBL واجد ژن bla_{TEM} و ۳/۷ درصد حامل ژن bla_{SHV} بودند (۱۸). در مطالعه Dahmen در سال ۲۰۱۳ بر روی جدایه‌های ESBL مثبت جداشده از موارد ورم پستان شامل *اشرشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه*، تمام جدایه‌های *اشرشیاکلی* حامل ژن bla_{CTX-M} و ۵۰ درصد آن‌ها حامل ژن bla_{TEM} بودند (۳۲). در مطالعه‌ای در هندوستان، Ghatak و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز ژن bla_{SHV} را در ۱۰۰ و ژن bla_{CTX-M} را ۸۷ درصد از جدایه‌های *اشرشیاکلی* جمع‌آوری‌شده از موارد ورم پستان گاوی گزارش کردند (۳۴). عدم حضور ژن‌های موردمطالعه در جدایه‌های ESBL مثبت مشاهده شده در مطالعه حاضر می‌تواند نشان‌دهنده ایجاد مقاومت توسط سایر ژن‌های مولد بتالاکتاماز باشد که در مطالعه‌ای مستقل باید بررسی شود.

نتیجه‌گیری نهایی: مقاومت بالای مشاهده‌شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حضور ژن‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در جدایه‌های *اشرشیاکلی* در مطالعه حاضر و احتمال انتقال مقاومت به جوامع انسانی ازطریق تماس با دام‌ها یا مصرف فراورده‌های لبنی، ضرورت اتخاذ راهکارهای عملی و برقراری سیستم پایش و اطلاع‌رسانی درخصوص الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی عوامل ایجادکننده ورم پستان گاوی در هر منطقه با هدف کاهش خطر ایجاد مقاومت میکروبی در بین باکتری‌ها را نشان می‌دهد.

عدم همکاری کارگران گاوداری‌ها در جمع‌آوری دقیق و به‌موقع نمونه‌ها و تجویز خودسرانه دارو پیش از ویزیت دامپزشک ازجمله محدودیت‌های مطالعه حاضر بود.

سپاسگزاری

نویسندگان کمال تشکر و قدردانی خود را از آقای دکتر سید امین موسوی‌آرا و کارشناسان آزمایشگاه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز که در انجام مراحل مطالعه حاضر یاری کردند، اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Malcata FB, Pepler PT, O'Reilly EL, Brady N, Eckersall PD, Zadoks RN, et al. Point-of-care tests for bovine clinical mastitis: what do we have and what do we need? J Dairy Res. 2020;87(S1):60-66. doi: 10.1017/S002202992000062X
2. Bradley A. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J. 2002;164(2):116-128. doi: 10.1053/tvjl.2002.0724 PMID: 12359466
3. Smith BP, Van Metre DC, Pasterla N. Large Animal Internal Medicine. 6th ed. Elsevier press. New York USA. 2019.
4. Argaw A. Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. FSQM. 2016;52:56-65.
5. Keane, OM, Budd J, Flynn KE, McCoy F. Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex etiology. Vet Rec. 2013;173(1):17. doi: 10.1136/vr.101308 PMID: 23694921
6. Krishnamoorthy P, Suresh KP, Jayamma KS, Shome BR, Patil SS, Amachawadi RG. An understanding of the global status of major bacterial pathogens of milk concerning bovine mastitis: A systematic review and meta-analysis (scientometrics). Pathogens. 2021;10(5),545. doi: 10.3390/pathogens10050545
7. Poutrel B, Bareille S, Lequeux G, Leboeuf F. Prevalence of mastitis pathogens in France: Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*. J Vet Sci Technol. 2018;9:522. doi: 10.4172/2157-7579.1000522
8. Naranjo-Lucena A, Slowey R. Invited review: Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens: A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European countries. J Dairy Sci. 2023;106(1):1-23. doi: 10.3168/jds.2022-22267
9. Bradley AJ, Green MJ. Adaptation of Escherichia coli to the bovine mammary gland. J Clin Microbiol. 2001;39(5):1845-9. doi: 10.1128/JCM.39.5.1845-1849.2001
10. Suojala L, Kaartinen L, Pyörälä S. Treatment for bovine Escherichia coli mastitis–an evidence-based approach. J Vet Pharmacol Ther. 2013;36(6):521-31. doi: 10.1111/jvp.12057
11. Burmańczuk A, Kowalski C, Roliński Z, Zań R, Krasucka D. Activity of β-lactam antibiotics against certain microorganisms which cause mastitis in cows. J Vet Res. 2016;60(3):267-71.
12. Troisi L, Granito C, Pindinelli E. Novel and recent synthesis and applications of b-Lactams. Top Heterocycl Chem. 2010;22:101-209. doi: 10.1007/7081_2009_12
13. Morosini MI, García-Castillo M, Tato M, Gijón D, Valverde A, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Rapid detection of β-Lactamase hydrolyzing extended-spectrum cephalosporin's in Enterobacteriaceae using the new chromogenic βLACTA™ test. J Clin Microbiol. 2014;52(5):1741-4. doi: 10.1128/JCM.03614-13
14. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):969-76. doi: 10.1128/AAC.01009-09 PMID: 19995920

15. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β-lactamases: neglected yet ubiquitous. Front Microbiol. 2016;7:1374:1-22.

16. Daneshffar N, Peeri Doghaheh H, Ghiamirad M. Molecular detection of TEM-1 type expended- spectrum beta-lactamase in Entrobacteriacea isolated from urinary tract infections in Ardabil, Iran. J Ardabil Univ Med Sci. 2015;15(2):144-153. (In Persian)

17. Farid S, Peeri Doghaheh H, Ghiamirad M. Prevalence of SHV-1 type expended- specterum beta-lactamase in Entrobacteriacea isolated from urinary Samples in Ardabil, Iran. J Ardabil Univ Med Sci. 2015;15(3):311-319. (In Persian)

18. Ahmed AM, Shimamoto T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. Microbiol Immunol. 2011;55(5):318-27. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00323.x PMID: 21338385

19. Quinn P, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatric ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2nd ed. Wiley-Black wel. New Jersey, USA. 2011.

20. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). M100. In Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed. CLSI: Annapolis Junction, MD, USA, 2020.

21. Mohammad Sadegh M, Badouei MA, Gorjidooz M, Daneshvar M, Koochakzadeh AA. Study on the clinical Coliform mastitis of Holstein cows on Garmsar suburban dairy farms. Vet Microbiol. 2012;8(2):137-49.

22. Saleki K, Moradi H. Bacterial agents of mastitis in dairy cow farms in Ilam city. JIUMS. 2013;20(4):88-95.

23. Malinowski E, Lassa H, Smulski S, Klossowska A, Kaczmarowski M. Antimicrobial susceptibility of bacteria isola. ted from cows with mastitis in 2006-2007. Bull Vet Inst Pulawy. 2008;52:565-572.

24. Mahantesh MK. and Basappa BK. Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bovine mastitis. Adv Appl Sci Res. 2011;2(6):229-235.

25. Firouzi R, Rajaian H, Tabaee IM, Saeedzadeh A. In vitro antibacterial effects of marbofloxacin on microorganisms causing mastitis in cows. J Vet Res. 2010;65(1):51-5. (In Persian)

26. Mbindyo CM, Gitao GC, and Mulei. CH M. Prevalence, etiology, and risk factors of mastitis in dairy cattle in embu and kajiado counties, kenya. Vet Med Int. 2020. Article ID 8831172, 12 pages. doi: 10.1155/2020/8831172

27. Phuektes P, Browning GF, Anderson G, Mansell PD. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae and Streptococcus uberis in bulk milk samples. J Dairy Res. 2003;70(2):149-55. doi: 10.1017/s0022029903006010 PMID: 12800868

28. Sumathi BR, Veeregowda BM, Amitha RG. Prevalence and antibiogram profile of bacterial isolates from clinical bovine mastitis. Vet World. 2008;1(8):237-8.

29. Lehtolainen T, Shwimmer A, Shpigel NY, Honkanen-Buzalski T, Pyörälä S. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. J Dairy Sci. 2003;86(12):3927-32. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)74001-6 PMID: 14740828

30. Bag AS, Rahman Khan S, Sami DH., Begum F, Islam S, Rahman M, et al. Virulence determinants and antimicrobial resistance of E. coli isolated from bovine clinical mastitis in some selected dairy farms of Bangladesh. Saudi J Biol Sci. 2021;28(11):6317-6323. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.06.099

31. Locatelli C, Caronte I, Scaccabarozzi L, Migliavacca R, Pagani L, Moroni P. Extended-spectrum β-lactamase production in *E. coli* strains isolated from clinical bovine mastitis. Vet Res Commun. 2009;33(1):141-4. doi: 10.1007/s11259-009-9263-y PMID: 19568948

32. Dahmen S, Métayer V, Gay E, Madec JY, Haenni M. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae causing* cattle mastitis in France. Vet Microbiol. 2013;162(2-4):793-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.10.015 PMID: 23127568

33. Yang F, Zhang S, Shang X, Wang X, Wang L, Yan Z, et al. Prevalence and characteristics of extended spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* from bovine mastitis cases in China. J Integr Agric. 2018;17(6):1246-1251.

34. Ghatak S, Singha A, Sen A, Guha C, Ahuja A, Bhattacharjee U, et al. Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from mastitis milk samples. Transbound Emerg Dis. 2013;60(5):385-9. doi: 10.1111/tbed.12119 PMID: 23870003