"Research article" **DOI: 10.71499/jvcp.2024.3091435**

Frequency of resistance to β-lactam antibiotics and the presence of beta-lactamase producing *bla$_{TEM}$* gene in *Escherichia coli* isolated from the milk of cows with mastitis

Vahabian, S.[1], Ghiamirad, M.[2*], Babazadeh Bedoustani, A.[3,4]

1- MSc. Graduate, Department of Cellular and Molecular Biology, Rabe Rashid Institute of Higher Education, Tabriz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.
3- Department of Biology, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4- Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: m_ghiyamirad@yahoo.com
(Received: 2023/10/25 Accepted: 2024/2/20)

Abstract

Mastitis is the most important economic disease threatening the dairy industry in the world. *Escherichia coli* are one of the major causes of mastitis, which is treated with antibiotics, especially β-lactams. The emergence and spread of resistance to antibiotics in livestock, as well as the possibility of transferring this resistance to humans, is a serious threat to public health in different communities. The present descriptive-cross-sectional study was conducted to determine the frequency of resistance to beta-lactams in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in Tabriz and also evaluate the presence of *bla*$_{TEM}$ gene in the isolates. For this purpose, 240 milk samples from cows with clinical mastitis were collected from different regions of Tabriz, Iran. First, the isolates obtained from the samples were identified based on standard microbiology methods, and their antibiotic sensitivity was evaluated by the disc diffusion method. Then, the confirmatory test of beta-lactamase enzyme producers was performed by the combined disc method. Finally, the presence of *bla*$_{TEM}$ gene in beta-lactamase-producing isolates was investigated using polymerase chain reaction (PCR). Based on the findings, *E. coli* was isolated from 50 milk samples of mastitis (20.83% of the samples). Also, in the phenotypic method, 22 isolates (44% of the isolates) were detected as beta-lactamase-producing. The molecular results also showed that only 7 of beta-lactamase-producing isolates in the phenotypic method had the *bla*$_{TEM}$ gene. Considering the high frequency of beta-lactamase-producing *E. coli* in the present study and the possibility of the spread of antibiotic resistance in the livestock population, as well as the possibility of transmission of resistance genes to humans, accurate identification and treatment of animals suffering from mastitis seems necessary.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Antibiotic resistance, *bla*$_{TEM}$, Bovine mastitis, *Escherichia coli*, Extended-spectrum β-lactamases.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.71499/jvcp.2024.3091435

ارزیابی فراوانی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حضور ژن مولد بتالاکتامازی bla_{TEM} در *اشریشیاکولای*‌های جداشده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان

سمیرا وهابیان[۱]، مهدی قیامی‌راد[۲*]، احمد بابازاده‌بدوستانی[۳و۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، موسسه آموزش عالی ربع رشید تبریز، تبریز، ایران.
۲- استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران.
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: m_ghiyamirad@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۸/۳ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱۲/۱)

چکیده

ورم پستان اقتصادی‌ترین بیماری تهدید کننده صنعت پرورش گاو شیری در جهان می‌باشد. *اشریشیاکولای* از جمله عوامل ایجادکننده ورم پستان می‌باشد که برای درمان آن از آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام استفاده می‌شود. ظهور و گسترش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جوامع دامی و همچنین احتمال انتقال این مقاومت به جوامع انسانی به عنوان تهدیدی جدی برای سلامت عمومی در جوامع مختلف می‌باشد. مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر با هدف تعیین فراوانی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام در *اشریشیاکولای*‌های جداشده از موارد ورم پستان گاوی در تبریز و همچنین تعیین حضور ژن مولد بتالاکتامازی bla_{TEM} در جدایه‌ها انجام شد. بدین منظور، تعداد ۲۴۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی از مناطق مختلف شهرستان تبریز جمع‌آوری شد. ابتدا جدایه‌های به‌دست آمده از نمونه‌ها بر اساس روش‌های استاندارد میکروبیولوژی، تعیین هویت شد و حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها به روش انتشار از دیسک بررسی گردیده و سپس آزمون تائیدی مولدین آنزیم بتالاکتاماز به روش دیسک ترکیبی انجام شد. در نهایت حضور ژن bla_{TEM} در جدایه‌های مولد بتالاکتاماز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بررسی گردید. براساس یافته‌ها، از ۵۰ مورد از نمونه‌های شیر ورم پستانی مورد بررسی، (۲۰/۸۳ درصد نمونه‌ها) *اشریشیاکولای* جداسازی شد. همچنین در روش فنوتیپی، ۲۲ جدایه *اشریشیاکولای* (۴۴ درصد جدایه‌های باکتری مذکور) مولد بتالاکتاماز تشخیص داده شدند. نتایج مولکولی هم نشان داد که فقط ۷ جدایه از جدایه‌های مولد بتالاکتاماز در روش فنوتیپی، واجد ژن bla_{TEM} بودند. با توجه به فراوانی بالای *اشریشیاکولای*‌های مولد بتالاکتاماز در مطالعه حاضر و احتمال گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت دامی و همچنین احتمال انتقال ژن‌های مقاومت به جوامع انسانی، شناسایی و درمان صحیح دام‌های مبتلا به ورم پستان ضروری به‌نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: ورم پستان گاو، *اشریشیاکولای*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، bla_{TEM}.

مقدمه

ورم پستان به التهاب غده پستانی بدون توجه به علت آن اطلاق می‌شود که به وسیله تغییرات فیزیکی و شیمیایی شیر و نیز تغییرات در بافت غده پستانی مشخص می‌شود (Salehi *et al.*, 2021; Blowey and Edmondson, 2010) و امروزه مهمترین چالش پیش روی صنعت پرورش گاو شیری بوده و خسارات اقتصادی فراوانی را به گاوداری‌ها و صنعت تولید لبنیات وارد می‌کند. از جمله این خسارات کاهش تولید و افت کیفیت شیر، هزینه‌های دارو و دامپزشکی، هزینه منابع تلف شده مثل حذف یا حتی مرگ احتمالی دام، حذف شیر در دوره بیماری و تاثیر نامطلوب بر باروری حیوان را می‌توان نام برد (Bradley, 2002; Smith *et al.*, 2019). ورم پستان به وسیله انواع باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها ایجاد می‌شود و به ۳ فرم بدون علامت، بالینی (حاد و مزمن) و تحت بالینی مشاهده می‌گردد (Argaw, 2016). باکتری‌های اصلی ایجاد کننده ورم پستان به ۲ دسته عوامل واگیردار شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *استرپتوکوکس آگالاکتیه* (*Streptococcus agalactia*)، *کورینه‌باکتریوم بویس*(*Corynebacterium bovis*)، *مایکوپلاسما بویس*(*Mycoplasma bovis*) و محیطی شامل *اشریشیاکولای*(*Escherichia coli*)، *استرپتوکوکس دیس‌گالاکتیه* (*Streptococcus dysgalactia*) و *استرپتوکوکس یوبریس* (*Streptococcus uberis*) تقسیم‌بندی می‌شوند (Keane *et al.*, 2013; Poutrel *et al.*, 2018; Krishnmoorthy *et al.*, 2021). از سایر عوامل باکتریایی ایجاد کننده ورم پستان می‌توان به *سودوموناس آئروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*Staphylococcus epidermidis*)، *کلبسیلا نومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*)، *کلبسیلا اکسی‌توکا* (*Klebsiella oxytoca*)، *کلبسیلا آئروجنز* (*Klebsiella aerogenus*)، و برخی گونه‌های متعلق به جنس‌های پاستورلا (Pasteurell) و پروتئوس (Proteus) هم اشاره کرد (Bradley and Green 2001; Naranjo *et al.*, 2023).

اشریشیاکولای (*E. coli*) باکتری گرم منفی، از خانواده انتروباکتریاسه است که به‌صورت فرصت طلب، ورم پستان‌های تحت‌بالینی و بالینی را در گاوها ایجاد می‌کند (Smith *et al.*, 2019). با توجه به این‌که برای درمان انواع ورم پستان، پس از شناسایی میکروارگانیسم مولد آن باید آنتی‌بیوتیک مناسب تجویز شود لذا بر این اساس، آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام از جمله داروهای مورد مصرف در درمان ورم پستان ناشی از *اشریشیاکولای* می‌باشند که در ساختار مولکولی خود حلقه بتالاکتام داشته و با جلوگیری از سنتز دیواره سلولی باکتری، باعث نابودی آن می‌شوند (Suojala *et al.*, 2013; Burmanczuk *et al.*, 2016). البته از طرف مقابل، باکتری‌ها هم توانائی‌های مختلفی مثل تغییر در نفوذپذیری، تغییر در پروتئین هدف دارو و تولید آنزیم‌های بتالاکتامازی را برای مصون ماندن از اثرات زیان‌بار آنتی‌بیوتیک‌ها به‌کار می‌گیرند. آنزیم‌های بتالاکتامازی از طریق هیدرولیز باند آمیدی حلقه بتالاکتام باعث ایجاد مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند. در سال‌های اخیر، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام نسل جدید در

درمان بیماری‌های عفونی منجر به بروز دسته جدید بتالاکتامازهای وسیع الطیف (Extended-Spectrum β-Lactamase; ESBLs) هم شده‌است (Troisi *et al.*, 2010; Morosini *et al.*, 2014). آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) نخستین بار در اواسط دهه ۱۹۸۰ در غرب اروپا و از باکتری کلبسیلا جدا گردیده و سپس آن‌ها را درگونه‌های مختلف خانواده انتروباکتریاسه یافت‌اند. ژن‌های تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف بر روی پلاسمید واقع شده و مقاومت متقاطع نسبت به کلاس‌های دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها را نیز ممکن می‌سازند. بر اساس عملکرد، آنزیم‌های بتالاکتامازی در ۴ کلاس اصلی A، B، C و D طبقه بندی می‌شوند که بر اساس این طبقه بندی، آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف، در کلاس A قرارگرفته‌اند (Bush and Jacoby, 2010).

اولین بتالاکتاماز پلاسمیدی در سال ۱۹۶۵ در یونان از کشت خون فردی به نام ترمونریا (Termoneria) در شهر آتن کشف و به‌نام *bla* TEM_1 نامگذاری شد. اندکی بعد آنزیمی نزدیک به آن کشف و نام TEM_2 بر آن گذاشته شد که علیرغم خصوصیات بیوشیمیایی یکسان، در یک اسید آمینه تفاوت داشتند که باعث تفاوت در نقطه ایزوالکتریک دو آنزیم می‌شد. آنزیم‌های بتالاکتامازی TEM_1 و TEM_2، پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های طیف باریک مثل سفالوتین یا سفازولین را هیدرولیز می‌کنند ولی در برابر سفالوسپورین‌های نسل بالاتر با زنجیره جانبی اکسی‌ایمینو مثل سفوتاکسیم موثر نیستند (Daneshfar *et al.*,2015; Liakopoulos *et al.*, 2016). تاکنون بالغ بر ۱۷۴ تحت‌تیپ از آنزیم‌های بتالاکتامازی *bla* TEM شناسایی شده‌است (Mehranfar *et al.*, 2016).

با توجه به اهمیت موارد ذکر شده در ارتباط با سلامت جمعیت‌های انسانی و دامی، مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام و بررسی حضور ژن مولد بتالاکتاماز bla_{TEM} در *اشریشیاکولای*‌های جداشده از موارد ورم پستان گاوی منطقه شهرستان تبریز انجام شده‌است.

مواد و روش‌ها

- جداسازی و تعیین هویت باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان

در مطالعه توصیفی- مقطعی حاضر، طی دوره یک ساله (۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰)، تعداد ۲۴۰ نمونه شیر، به صورت تصادفی از گاوهای دارای علائم ورم پستان بالینی در تعدادی از گاوداری‌های صنعتی منطقه شهرستان تبریز، تحت شرایط استریل و طبق روش استاندارد جمع آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم-پزشکی تبریز منتقل شدند. لازم به ذکر است که هیچ‌کدام از گاوهای مذکور قبل از نمونه‌برداری درمان آنتی‌بیوتیکی دریافت نکرده‌بودند. در آزمایشگاه میکروب‌شناسی برای شناسایی باکتری‌های ایجاد کننده ورم پستان از آزمایش‌های متداول و کشت در محیط‌های لازم استفاده شد. به‌طوری‌که جهت جداسازی و شناسایی باکتری *اشریشیاکولای* از سایر باکتری‌های احتمالی موجود در نمونه‌های شیر، از کشت در محیط‌های افتراقی و اختصاصی مرسوم مانند

مک‌کانکی آگار،EMBagar، TSIagar، SMI، اوره آگار، ژلاتین، سیمون سیترات آگار، VP-MRbroth (همگی ساخت شرکت مرک -آلمان) و نیز آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، احیاء نیترات و تخمیر قندها استفاده شد (Quinn *et al*., 2011).

- تعیین الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

در تحقیق حاضر، جهت تعیین الگوی مقاومت و حساسیت *اشریشیاکولای*‌های جدا شده از نمونه‌های شیر، از روش دیسک دیفیوژن (بر اساس اصول کربی-بائر) استفاده شد. بدین منظور، از دیسک‌های استریل آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰µg)، جنتامایسن (۱۰µg)، کوتریماکسازول (۲µg)، سفکسیم (۵µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتازدیم (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، سفتی‌زوکسیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg)، نالدیسیک اسید (۳۰µg) و ایمی‌پنم (۱۰µg) که همگی ساخت شرکت Himedia (India) بودند، طبق روش توصیه شده توسط CLSI استفاده شد (CLSI, 2020).

- آزمون فنوتیپی جهت تعیین تولید بتالاکتامازهای وسیع الطیف توسط جدایه‌ها

در ادامه جهت تعیین مولدین ESBLs در میان *اشریشیاکولای*‌های جدا شده، از روش آزمون دیسک ترکیبی استفاده شد. بدین منظور از دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰µg µg) و سفوتاکسیم (۳۰µg) به همراه دیسک ترکیبی آن‌ها، سفتازیدیم/کلاولونیک اسید (۳۰ µg/۱۰µg) و سفوتاکسیم/کلاولونیک اسید (۱۰µg/ ۳۰µg) ساخت شرکت Himedia (India) استفاده شد. به‌این منظور سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند از جدایه‌های مورد بررسی تهیه و بر روی محیط مولر-هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های فوق به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر منطقه عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کلاولونیک اسید نسبت به قطر منطقه عدم رشد در اطراف دیسک بدون کلاولونیک اسید از همان آنتی‌بیوتیک، سنجیده شد. در مواردی که قطر منطقه عدم رشد باکتری در اطراف دیسک ترکیبی، ≥۵ میلی‌متر بیشتر از قطر منطقه عدم رشد اطراف دیسک تکی همان آنتی‌بیوتیک بود، سویه مورد نظر، بر اساس ضوابط CLSI به عنوان سویه بتالاکتاماز مثبت در نظر گرفته شد (CLSI, 2020).

- استخراج DNA از ژنوم جدایه‌های مورد نظر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شده

آزمایشات مولکولی این تحقیق در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام گرفت به منظور استخراج DNA از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. سنجش غلظت و کیفیت DNA های استخراج شده هم به کمک دستگاه نانودرآپ (Thermo, USA) انجام شد. لازم به ذکر است که در DNAخالص استخراجی، نسبت جذب در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، برابر ۱/۸ الی ۲ می‌باشد (Ahmadi *et al*., 2012).

در ادامه جهت شناسایی ژن بتالاکتامازی TEM در جدایه‌های مورد نظر، از یک جفت پرایمر اختصاصی تایید شده توسط دانشفر و همکاران و آزمون PCRساده استفاده شد که حاصل آن تولید محصولی به اندازه ۱۱۱۹جفت باز بود. لازم به ذکر است که پرایمرهای مورد نظر، مطابق مشخصات ارائه شده در

جدول۱، توسط شرکت سیناژن (تهران- ایران) ساخته شده و در تحقیق حاضر استفاده گردیده‌است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمونPCR جهت شناسائی ژن *bla* TEM

نام پرایمرها	توالی پرایمرها (3′ <---5′)	اندازه محصول حاصله از PCR (bp)	منبع
TEM/	5′-GGGGAGCTCATAAAATTCTTGAAGAC-3′	۱۱۱۹ جفت باز	Daneshfar *et al*.,2015
TEM/R	5′-GGGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA-3′		

در جدول ۲ مشخصات و مقادیر استفاده شده از هر یک از ترکیبات لازم جهت انجام آزمون PCR مورد نظر در تحقیق حاضر ارائه شده‌است.

جدول ۲- مقدار ترکیبات استفاده شده در آزمونPCR جهت شناسائی ژن *bla* TEM

مواد مصرفی	برای یک نمونه
بافر PCR، 10X	۲/۷ میکرو لیتر
بازهای آلی	۰/۵۴ میکرو لیتر
کلرید منیزیوم	۰/۸ میکرو لیتر
پرایمر فوروارد	۰/۸ میکرو لیتر
پرایمر ریورس	۰/۸ میکرو لیتر
آنزیم Taq DNA پلیمراز	۰/۳ میکرو لیتر
DNA الگو	۲/۵ میکرو لیتر
آب دیونیزه	۱۱/۶ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۰میکرولیتر

همچنین در طی تحقیق حاضر، واکنش PCR مورد نظر، تحت برنامه دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) شامل یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴°C جهت انجام واسرشتگی اولیه، سپس طی ۳۵ چرخه دمائی مشابه که هریک شامل ۳۵ ثانیه در دمای ۹۴°C به منظور واسرشت سازی ثانویه، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰°C جهت اتصال و ۲ دقیقه در دمای ۷۲°C به منظور طویل شدن و نیز درپایان یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C به منظور طویل سازی محصول نهایی بود ، صورت گرفت. لازم به ذکر است که در طی واکنش PCR انجام گرفته در مطالعه حاضر، از سویه‌ای استاندارد از باکتری *Klebsiella pneumonia* (ATCC:700603)به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه استریل، به عنوان کنترل منفی استفاده شده‌است.

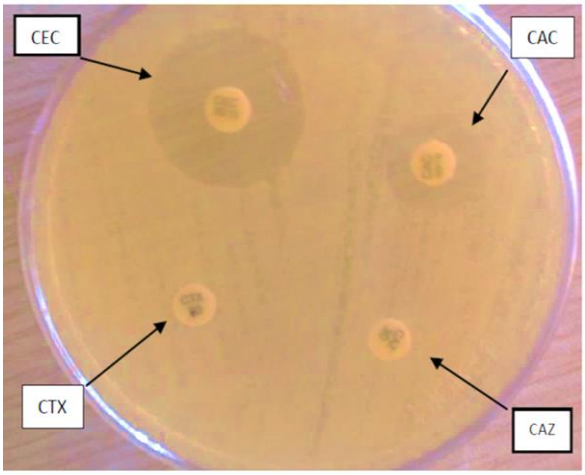
در نهایت عمل الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از دستگاه پاورسوپلای (Bio-Rad, USA) دارای اختلاف پتانسیل الکتریکی مستقیم ۱۰۰ ولت، بر روی ژل آگاروز ۱درصد و به مدت ۳۰ دقیقه در کنار سایز مارکر (DNA ladder) ۱۰۰ جفت بازی شرکت

سیناژن (تهران-ایران) انجام شد. در ادامه و پس از رنگ آمیزی با DNA safe stain شرکت سیناژن (تهران-ایران)، وضعیت و اندازه باندهای حاصله، با استفاده از دستگاه ژل داکومنتیشن، (Labnet, USA) زیر نور اشعه ماوراء بنفش، مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که حضور باند قوی به اندازه ۱۱۱۹ جفت باز، نشان دهنده تکثیر قطعه مورد نظر و تایید وجود ژن مولد بتالاکتامازی TEM در جدایه مورد آزمایش بود.

یافته‌ها

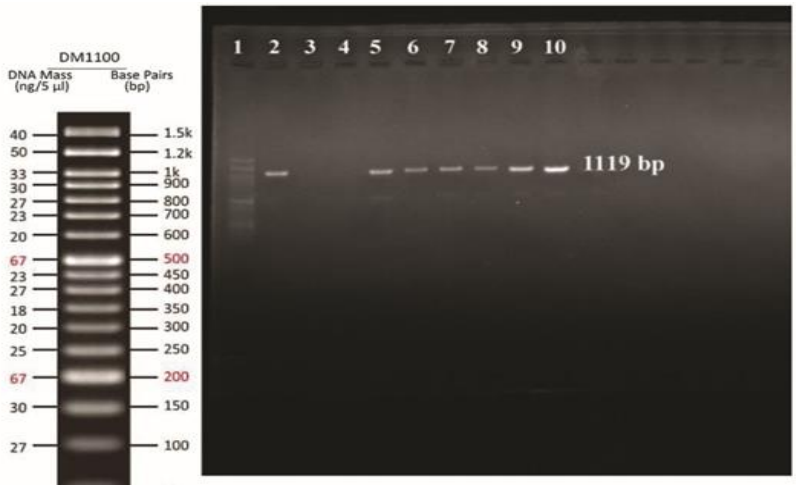
از ۲۴۰ نمونه شیر آزمایش شده براساس روش‌های فنوتیپی میکروب‌شناسی تشخیصی، در ۵۰ نمونه (۲۰/۸۳ درصد نمونه‌ها)، باکتری *اشریشیاکولای* جداسازی و شناسایی شد.

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *اشریشیاکولای* هم نشان داد که بیشترین مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفتازیدیم (با فراوانی۹۸ درصد)، سفتی زوکسیم (با فراوانی۹۰ درصد) سفوتاکسیم و آمپی‌سیلین (هردو با فراوانی ۸۸ درصد) و بیشترین حساسیت نیز به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریماکسازول (با فراوانی ۱۰۰ درصد) و جنتامایسین (با فراوانی۹۳ درصد) وجود دارد. از طرف دیگر، در بررسی فنوتیپی برای تعیین تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسط جدایه‌های مذکور هم مشخص کردید که از ۵۰ جدایه مورد مطالعه، ۲۲ جدایه (۴۴ درصد جدایه‌های *اشریشیاکولای*) مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف هستند (شکل ۱).



شکل ۱- نمونه‌ای از نتایج بررسی فنوتیپی حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را نشان می‌دهد. دیسک‌های قسمت بالای تصویر حاوی کلاولونیک اسید و دیسک‌های پایین تصویر، حاوی همان آنتی‌بیوتیک‌ها و البته بدون کلاولونیک اسید می‌باشند.

همچنین در تحقیق حاضر، بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون PCR جدایه‌های مولد ESBLs و بررسی یافته‌های مربوط به الکتروفورزیس محصولات PCR، از مجموع ۲۲ جدایه مذکور، مطابق شکل ۲ ارائه شده، فقط ۷ جدایه (۳۱/۸۱ درصد از جدایه‌های *اشریشیاکولای* مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف) حامل ژن bla_{TEM} تشخیص داده‌شدند.



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصولات آزمون PCR انجام گرفته جهت بررسی حضور ژن bla_{TEM} در جدایه‌های مولد ESBLs را نشان می‌دهد که در ردیف اول مارکر SMOBiO در ردیف دوم کنترل مثبت (نمونه توالی یابی شده) ، ردیف سوم نمونه کنترل منفی، ،ردیف چهارم نمونه منفی، ردیف ۵ تا ۱۰ نمونه‌های مثبت با باندی به اندازه ۱۱۱۹ جفت باز، مشاهده می‌گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از ۲۴۰ نمونه شیر ورم پستانی بررسی شده، باکتری *اشریشیاکولای* عامل ایجاد بیماری در ۵۰ مورد (۲۱/۸۳ درصد) تشخیص داده شد.

در این مطالعه بیشترین حساسیت جدایه‌های مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کوتریموکسازول (۱۰۰ درصد) و جنتامایسین (۹۳ درصد) مشاهده شد. در این ارتباط در مطالعه محمد صادق و همکاران که بر روی *اشریشیاکولای*‌های جدا شده از موارد ورم پستان گاوها در منطقه گرمسار انجام گرفته، بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با فراوانی ۹۲ درصد گزارش شده و نیز حساسیت نسبت به به کوتریموکسازول را ۸۰ درصد اعلام کرده‌اند (Mohammadsadegh *et al*., 2012)، همچنین در این خصوص، در تحقیق سوماتی و همکاران در بنگلور، بیشترین حساسیت نسبت به جنتامایسین با فراوانی ۹۰ درصد و بیشترین مقاومت هم نسبت به سولفادیازین و استرپتومایسین گزارش شده‌است (Sumathi *et al*., 2008). در مطالعه لهتولاینن و همکاران در فنلاند نیز بیشترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین گزارش شده و در این مطالعه میزان کلی مقاومت بسیار کمتر از مطالعه حاضر و مطالعات مشابه بوده‌است (Lehtolainen *et al*., 2009). در تحقیق مشابهی در بنگلادش هم که توسط باگ و همکاران انجام گرفته، بیشترین حساسیت نسبت به جنتامایسین و کمترین حساسیت نسبت به آموکسی‌سیلین گزارش شده‌است (Bag *et al*., 2021). به نظر می‌رسد که اختلافات مشاهده شده در میزان مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه را می‌توان با الگوی متفاوت مصرف آنتی‌بیوتیک در درمان ورم پستان در مناطق مختلف، مصرف خودسرانه دارو در سطح دامداری‌های منطقه و سطح بهداشتی دامپروری‌ها، کیفیت دیسک‌های مورد استفاده در مطالعه،

روش بررسی مقاومت و دریافت آنتی‌بیوتیک قبل از نمونه برداری در ارتباط دانست.

همچنین در بررسی فنوتیپی با استفاده از آزمون دیسک ترکیبی برای تعیین تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسط جدایه‌ها مشخص گردید که از ۵۰ جدایه *اشریشیاکولای* مورد مطالعه، ۲۲ جدایه (۴۴ درصد جدایه‌های *اشریشیاکولای*) مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs مثبت) هستند. در این ارتباط، در مطالعه لوکاتللی در ایتالیا این مقدار ۲۲/۷۲ درصد (Locatelli *et al*., 2009)، در مطالعه داهمن و همکاران در فرانسه (۰/۴ درصد) و در مطالعه یانگ و همکاران در چین ۲۲/۹۶ درصد گزارش شده‌است (Dahmen *et al*., 2013; Yang *et al*., 2018).

از طرف دیگر براساس یافته‌های قسمت ژنوتیپی مطالعه حاضر، از ۲۲ جدایه ESBLs مثبت باکتری *اشریشیاکولای*، فقط تعداد ۷ جدایه (۳۱/۸ درصد از جدایه‌های *اشریشیاکولای* مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف) حامل ژن bla_{TEM} بودند. در این مطالعه در هیچ‌کدام از جدایه‌هایی که با روش فنوتیپی ESBL تشخیص داده نشده بودند، ژن مورد مطالعه یافت نشد. این امر می‌تواند نشان دهنده اهمیت حضور ژن مورد مطالعه در ایجاد مقاومت گسترده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام باشد. در این ارتباط در مطالعه یانگ و همکاران در چین نیز ۷۱/۲۲ درصد جدایه‌های ESBLs مثبت باکتری *اشریشیاکولای*، جدا شده از موارد ورم پستان، واجد ژن bla_{TEM-1} بوده‌اند (Yang *et al*., 2018). همچنین در مطالعه باگ و همکاران در بنگلادش که بر روی *اشریشیاکولای*‌های جدا شده از موارد ورم‌پستان انجام شده، ژن bla_{TEM} در۳۳/۸۸ درصد جدایه‌ها مشاهده شده‌است (Bag *et al*., 2021). در تحقیقی مشابه در مصر نیز، ۲۲/۲۲ درصد از جدایه‌های *اشریشیاکولای* ESBLs مثبت، واجد ژن bla_{TEM} و ۳/۷ درصد هم واجد ژن bla_{SHV} بوده‌اند (Ahmad *et al*., 2011). در مطالعه داهمن و همکاران نیز که بر روی جدایه‌های ESBLs مثبت باکتری‌های *اشریشیاکولای* و *کلبسیلا نومونیه*، جدا شده از موارد ورم پستان انجام گرفته، فقط ۵ درصد جدایه‌های *اشریشیاکولای* حامل ژن bla_{TEM} بوده‌اند (Dahmen *et al*., 2013). احتمالاً عدم حضور ژن‌های مورد مطالعه در جدایه‌های ESBL مثبت مشاهده شده در مطالعه حاضر می‌تواند نشان دهنده ایجاد مقاومت توسط سایر ژن‌های مولد بتالاکتاماز باشد که در مطالعه‌ای مستقل باید بررسی شوند. نوع پرایمرهای مورد استفاده و نیز توزیع جغرافیایی ژن‌های مورد مطالعه می‌تواند از دلایل تفاوت میزان حضور ژن‌های ایجاد کننده مقاومت در مطالعات مختلف باشد.

نتیجه نهائی این‌که، مشاهده مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و حضور ژن‌های مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در جدایه‌های *اشریشیاکولای* و توجه به احتمال انتقال مقاومت‌های داروئی به جوامع انسانی از طریق تماس با دام‌ها یا مصرف فرآورده‌های لبنی، ضرورت اتخاذ راهکارهای عملی و استفاده هدفمند از آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد نتایج آن مستقیما در سلامت دام، افراد در تماس با دام‌ها و محیط منعکس شده و از انتشار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی جلوگیری کند.

سپاسگزاری

این مقاله در برگیرنده نتایج بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروب شناسی موسسه آموزش عالی ربع رشید تبریز می‌باشد. نویسندگان مراتب تشکر خود را از آقای دکتر سید امین موسوی آرا و همچنین کارکنان و مسئولین آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز که در این تحقیق همکاری داشتند، اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Ahmadi, A., Mehrabani-Yeganeh, H., Miraei-Ashtiani, S.R., Nejati-Javaremi, A., Pakdel, A. and Bendixen, C. (2012). Quantity and quality checking of quail DNA extracted by modified salting out method and genomic sequencing. Agricultural Biotechnology, 11(1): 41-49
- Ahmed, A.M. and Shimamoto, T. (2011). Molecular characterization of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. Microbiology and Immunology. 55(5): 318-27
- Argaw, A. (2016). Review on epidemiology of clinical and subclinical mastitis on dairy cows. Food Safety and Quality Management, 52: 2224-6088.
- Bag, A.S., Rahman Khan S., Sami D.H., Begum F., Islam S., Rahman M., *et al*. (2021). Virulence determinants and antimicrobial resistance of E.coli isolated from bovine clinical mastitis in some selected dairy farms of Bangladesh. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(11): 6317-6323.
- Blowey, R. and Edmondson P. (2010). Mastitis Control in Dairy Herds. Wallingford, 2nd ed. CABI.
- Bradley, A.J., and Green M.J. (2001). Adaptation of Escherichia coli to the bovine mammary gland. Journal of Clinical Microbiology. 39(5): 1845-1849.
- Bradley, A.J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. Veterinary Journal, 164(2): 116-128.
- Burmańczuk, A., Kowalski, C., Roliński, Z., Zań, R. and Krasucka, D. (2016). Activity of β-lactam antibiotics against certain microorganisms, which cause mastitis in cows. Journal of Veterinary Research. 60(3): 267-271.
- Bush, K. and Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 54(3): 969-976.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2020). M100. In Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI: Annapolis Junction, MD, USA,
- Dahmen, S., Métayer, V., Gay, E., Madec, J.Y. and Haenni, M. (2013). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. Veterinary Microbiology. 2013; 162(2-4): 793-799.
- Daneshffar, N. Peeri Doghaheh, H. and Ghiamirad M. (2015). Molecular detection of TEM-1 type expended- spectrum beta-lactamase in Entrobacteriacea isolated from urinary tract infections in Ardabil, Iran. Journal of Ardabil University of Medical Sciences, 15(2): 144-153. [In Persian]
- Firouzi, R., Rajaian, H., Tabaee, I.M. and Saeedzadeh, A. (2010). In vitro antibacterial effects of marbofloxacin on microorganisms causing mastitis in cows. Journal of Veterinary Research. 65(1): 51-55. [In Persian]

- Ghatak, S., Singha, A., Sen, A., Guha, C., Ahuja, A., Bhattacharjee, U., *et al*. (2013). Detection of New Delhi metallo-beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolated from mastitic milk samples. Transboundary and Emerging Diseases, 60(5): 385-389
- Keane, O.M., Budd, J. Flynn K.E. and McCoy, F. (2013). Pathogen profile of clinical mastitis in Irish milk-recording herds reveals a complex etiology. Veterinary Record, 173(1): 17-27
- Krishnamoorthy, P., Suresh, K.P., Jayamma, K.S., Shome, B.R., Patil, S.S., and Amachawadi, R.G. (2021). An understanding of the global status of major bacterial pathogens of milk concerning bovine mastitis: A systematic review and meta-analysis (scientometrics). Pathogens, 10(5): 545-560.
- Lehtolainen, T., Shwimmer, A., Shpigel, N.Y., Honkanen-Buzalski, T. and Pyörälä, S. (2003). In vitro antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. Journal of Dairy Science, 86(12): 3927-3932.
- Locatelli, C., Caronte, I., Scaccabarozzi, L., Migliavacca, R., Pagani, L., and Moroni, P. (2009). Extended-spectrum β-lactamase production in E. coli strains isolated from clinical bovine mastitis. Veterinary Research Communications, 33(1): 141-144.
- Mahantesh, M.K. and Basappa, B.K. (2011). Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bovine mastitis. Advances in Applied Science Research, 2(6): 229-235.
- Malinowski, E., Lassa, H., Smulski, S., Klossowska, A., Kaczmarowski, M. (2008). Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from cows with mastitis in 2006-2007. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 52: 565-572.
- Mbindyo, C.M., Gitao, G.C. and Mulei, CH.M. (2020). Prevalence, etiology, and risk factors of mastitis in dairy cattle in embu and kajiado counties. Kenya Veterinary Medicine International. Article ID 8831172, 12 pages.
- Mehranifar, Z., Salehi, M. and Amini, K. (2016). Detection of bla TEM, bla OXA and bla SHV genes in Escherichia coli isolated from colibacillosis in poultry by multiplex-PCR. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 10(1): 81-89. [In Persian]
- MohammadSadegh, M., Badouei, M.A., Gorjidooz, M., Daneshvar, M. and Koochakzadeh, AA. (2012). Study on the clinical Coliform mastitis of Holstein cows on Garmsar suburban dairy farms. Veterinary Microbiology. 8(2): 137-49. [In Persian]
- Morosini, M.I., García-Castillo, M., Tato, M., Gijón, D., Valverde, A., Ruiz-Garbajosa, P. and Cantón, R. (2014). Rapid detection of β-Lactamase hydrolyzing extended-spectrum cephalosporin's in Enterobacteriaceae using the new chromogenic βLACTA™ test. Journal of Clinical Microbiology. 52(5): 1741-1744.
- Naranjo-Lucena, A. and Slowey, R. (2023). Invited review: Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens: A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European countries. Journal of Dairy Science, 106(1): 1-23.
- Poutrel, B., Bareille S., Lequeux G. and Leboeuf F. (2018). Prevalence of mastitis pathogens in France: Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, and Escherichia coli. Journal of Veterinary Science and Technology, 9(2): 522-525.
- Phuektes, P., Browning, G.F., Anderson, G. and Mansell P.D. (2003). Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae and Streptococcus uberis in bulk milk samples. Journal of Dairy Research, 70(2): 149-55.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Fitzpatric, E.S., Fanning, S. and Hartigan, P.J. (2011). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Wiley- Black well, 179-263, 837-851.
- Saleki, K. and Moradi, H. (2013). Bacterial agents of mastitis in dairy cow farms in Ilam city. Journal of Ilam University of Medical Sciences, 20(4): 88-95. [In Persian]
- Salehi, S., Anzabi, Y., kaveh, A.A. (2021). Antibiotic resistance pattern and presence of biofilm producing ica operon virulence genes in coagulase positive Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in East Azerbaijan province. Veterinary Clinical Pathology, 15(59): 253-269. [In Persian]

- Smith, B.P., Van Metre, D.C. and Pasterla, N. (2019). Large Animal Internal Medicine. 6th ed., USA. Elsevier, pp: 1231-1310.
- Suojala, L., Kaartinen, L. and Pyörälä, S. (2013). Treatment for bovine Escherichia coli mastitis–an evidence-based approach. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 36(6): 521-531.
- Troisi, L., Granito C. and Pindinelli, E. (2010). Novel and recent synthesis and applications of b-lactams. Topics in Heterocyclic Chemistry, 22: 101-209
- Sumathi, B.R., Veeregowda, B.M. and Amitha, R.G. (2008). Prevalence and antibiogram profile of bacterial isolates from clinical bovine mastitis. Veterinary World, 1(8): 237-238.
- Yang, F., Zhang, S., Shang, X., Wang, X., Wang, L., Yan, Z., *et al*. (2018). Prevalence and characteristics of extended spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli from bovine mastitis cases in China. Journal of Integrative Agriculture, 17(6): 1246-1251.