Archive of SID

نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۱ تابستان ۱۳۹۵
DOI: 10.22034/vj.2016.106059

جداسازی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و ژن اینتگرون کلاس I از نمونه‌های ورم پستان تحت بالینی گاوهای شیری استان تهران

• **علیرضا مختاری**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
• **تقی زهرایی صالحی (نویسنده مسئول)**
استاد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران
• **کیومرث امینی**
استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
• **فرشته شاهچراغی**
استاد، گروه باکتری‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
تاریخ دریافت: شهریور ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴
Emali: tsalehi@ut.ac.ir

چکیده

باکتری سودوموناس آئروژینوزا از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت طلب بوده که موجب بروز ورم پستان‌های تحت بالینی مقاوم به درمان در گاوهای شیری می‌باشد. هدف این مطالعه، شناسایی اینتگرون‌های کلاس I در باکتری سودوموناس آئروژینوزای جداشده از ورم پستان و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۱۵۰ نمونه شیر خام از دامداری‌های مختلف استان تهران و تعدادی نیز از منطقه شهرکرد جمع‌آوری و بر روی محیط‌های اختصاصی کشت داده شد. آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و میزان MIC با E-test مطابق دستورالعمل CLSI با آنتی بیوتیک‌هایی از گروه‌های مختلف انجام گردید. جهت شناسایی ژن اینتگرون کلاس I از آزمون PCR استفاده شد. از مجموع ۱۵۰ نمونه شیر، ۵۱ نمونه ۳۴ درصد آلوده به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بودند. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کانامایسین به میزان ۱۰۰ درصد، ۹۴/۲ و ۹۴/۲ درصد به ترتیب مشاهده شد. بیشترین مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیکهای کانامایسین/آمپی سیلین/تتراسایکلین مشاهده شد. نتایج MIC مشخص نمود که نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بین ۲-۰/۷۵ µg، به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بین ۰/۳۸-۰/۰۹۴ µg و به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین بین ۴-۰/۰۵ µg حساس می‌باشند. نتایج مولکولی نشان داد، ۱ جدایه (۱/۹۶ درصد) واجد ژن اینتگرون (int-1) می‌باشد. از آنجا که بیشتر اینتگرون‌ها، ژن‌ها و آنزیم‌های تغییر دهنده فعالیت آنتی‌بیوتیکها را کد می‌کنند، حضور ژن‌های اینتگرون در نمونه‌های شیر خام درمان عفونت ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا حاوی این ژن را به دلیل فقدان آنتی‌بیوتیک جدید که طیف درمان وسیعی داشته باشد، با مشکل جدی روبرو می‌نماید.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، اینتگرون کلاس I، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ورم پستان گاو

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 37-44

Isolation Pseudomonas aeruginosa bacteria and genes integron class I of subclinical mastitis in dairy cows in Tehran

By: Mokhtari, A.R,. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Zahraei Salehi, T., (Corresponding Author) Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Amini, K., Assistant Professor, Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. Shahcheraghi, F., Professor, Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: August 2015 Accepted: November 2015

Emali: tsalehi@ut.ac.ir

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen that causes subclinical mastitis resistant to treatment, in lactating dairy cows. The Purpose of this study, were to identify class I integrons and determining antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mastitis. In this cross-sectional study, 150 samples of raw milk were collected from different farms, transported to the laboratory and cultured on specific media. Antimicrobial susceptibility test conducted by disk diffusion method and MIC (Minimum Inhibitory Concentration) determination test performed by E-test in accordance with CLSI guidelines, in various groups. To identify Class I integron gene PCR test were used. Of total number 150 milk samples, 51 samples (34%) were contaminated with *Pseudomonas aeruginosa.* Antibiotic test results showed that the highest rate of resistance were observed to Ampicillin, Tetracycline and Kanamycin at the rate of 100%, 94.2% and 94.2%, respectively. Most multiple resistances were observed against Kanamycin, Ampicillin and Tetracycline antibiotics. MIC results showed that isolated bacteria were sensitive to Gentamicin in concentration 0.75-2 µg, Ciprofloxacin at 0.094-0.38 µg and Amikacin at 0.05-4 µg. Results molecular tset showed, one isolate (1.96%) were carried Integrons gene (int-1). Since most integrons genes coding enzymes that inactive antibiotics, presence of Integrons genes in samples of raw milk, treatment infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* wich carring these genes, because of the lack of new antibiotics that have a broad therapeutic range, would creat the major problems.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Integron Class I, Antibiotic Resistance, Bovine mastitis

مقدمه

باکتری سودوموناس آئروژینوزا از مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت طلب بوده که تمایل ویژه‌ای به محیط‌های مرطوب داشته و به طور وسیع در خاک، آب و گیاهان، کود و پوست حیوانات یافت می‌شوند. علاوه بر این گاهی در پوست، گوش خارجی، سیستم تنفسی فوقانی و یا روده بزرگ اشخاص سالم نیز حضور داشته و موجب بیماری‌های مختلفی در انسان و دام از جمله عفونتهای ادراری، پنومونی مزمن در بیماران سیستیک فیبروزیس، عفونت چشم و گوش و عفونت‌های زخم، ورم پستان با مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌گردد (۱۶, ۱۳). در دام‌ها این باکتری از عوامل بیماری‌زای مقاوم به درمان می‌باشد که ضررهای اقتصادی بالایی را به صنعت دامپروری وارد می‌کند. سودوموناس آئروژینوزا، به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده ورم پستان‌های کلینیکی با شیوع ناگهانی در گاوهای شیری مطرح می‌باشد. این باکتری کمتر از ۱ درصد و یا بیشتر از ۳ درصد گله را درگیر نموده و موجب ورم پستان‌های مزمن تحت بالینی می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا در آمریکا بیش از ۲ بیلیون دلار، انگلستان ۹۳ میلیون یورو و در استرالیا ۱۰۰ میلیون دلار سالانه ضرر اقتصادی را به دامداران تحمیل می‌کند (۶). بیماری ورم پستان ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در اثر عواملی مانند آب آلوده، ضدعفونی نامناسب کارتیه‌ها و درمان نامناسب در دوران خشکی ایجاد می‌گردد و کارتیه‌های گاوها به عنوان مخزن انتقال باکتری سودوموناس آئروژینوزا عمل می‌نماید (۱۶). ورم پستان حاد ناشی از سودوموناس آئروژینوزا معمولاً به عفونت مزمن تبدیل شده و حتی قانقرایایی شدن حاد در ۱۰ درصد موارد ابتلاء به ورم پستان گزارش شده است (۲۳). از عوامل تاثیرگذار بر میزان بروز ورم پستان در دامداری‌ها با عامل سودوموناس آئروژینوزا، مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها، شرایط محیط دامداری‌ها (مخازن آب، وسایل شیردوشی)، اجرای برنامه‌های نامناسب مدیریتی و سطح ایمنی میزبان می‌باشد (۱۵). آنزیم‌های تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا در شیر در دمای پاستوریزاسیون باقی مانده و موجب تخریب چربی شیر و محصولات لبنی می‌گردد (۱۸, ۴). مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در این باکتری دارای مکانیسم‌های متفاوتی از جمله: بتالاکتامازها، عوامل پلاسمیدی و ترانسپوزون، پمپ‌های انتشار دارو، بیوفیلم‌ها، تغییرنفوذپذیری غشای خارجی می‌باشد. همچنین مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به دو صورت ذاتی و اکتسابی می‌باشد. در مقاومت ذاتی، سلول طبیعی و یا وحشی قادر به مهار آنتی‌بیوتیک‌ها بوده و منشاء کروموزومی دارد. در حالی که مقاومت

www.SID.ir

Archive of SID

اکتسابی در اثر قرار گرفتن جمعیت‌های حساس و طبیعی در معرض عوامل مختلف و تبدیل سویه‌های حساس به مقاوم ناشی می‌شود (۱۶, ۱). آگاهی از چگونگی انتشار سویه‌های این باکتری، از اهمیت اپیدمیولوژیک ویژه‌ای به منظور یافتن منبع عفونت، ارزیابی چگونگی انتشار سویه‌ها و کنترل سریع شیوع پاتوژن به ویژه سویه‌های مقاوم چند دارویی، برخوردار است (۱۷). درمان این بیماری با آنتی بیوتیک‌های متداول به دلیل تولید آنزیم بتالاکتاماز معمولاً با مقاومت آن همراه می‌باشد، که استفاده از پروتکل درمانی چند آنتی بیوتیک و داروهای مقاوم به بتالاکتاماز موفق می‌باشد (۲۲). مقاومت ذاتی باکتری سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل حضور پروتئین‌های اختصاصی موجود در غشای خارجی این باکتری می‌باشد. لیپوپروتئین‌های موجود در غشای خارجی با تاثیر بر روی سیستم انتشار دارو و ناتراوایی در غشای سلول باکتری موجب ایجاد مقاومت در سودوموناس آئروژینوزا می‌گردد (۲۲). بسیاری از ژن‌های مقاومت ضد میکروبی با عناصر ژنتیکی که اینتگرون نامیده می‌شوند ارتباط دارند. اینتگرون‌ها می‌توانند روی کروموزوم، پلاسمید و همچنین ترانسپوزون‌ها قرار گیرند (۹). مشخص شده است که بین ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی و برخی از اینتگرون‌ها به ویژه اینتگرون‌های کلاس I ارتباط قوی وجود دارد. ماهیت سیار بودن این عناصر ژنتیکی، مقدمات انتشار هرچه بیشتر این آنزیم ها و نهایتاً ایجاد مقاومت را فراهم می‌سازد (۸). تمام اینتگرون‌هایی که تا امروز شناسایی شده‌اند دارای سه عنصر ضروری زیر برای وارد کردن ژن‌های خارجی می‌باشند: الف) ژن int I که آنزیم اینتگراز را کد می‌کند. این اینتگراز متعلق به خانواده تیروزین ریکامبیناز می‌باشد و سبب وارد شدن ژن خارجی به ساختار اینتگرون می‌گردد. ب) att I site که محل قرارگیری ژن خارجی می باشد و ژن های مقاومت در این مکان وارد می شود. ج) Pc که پرموتور می‌باشد و محل صحیح رونویسی را برای آنزیم رونویسی مشخص می‌کند و سبب بیان صحیح ژن‌های وارد شده در ساختار اینتگرون می‌شود (۲۴). شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سودوموناس آئروژینوزا در حال افزایش است که بیشتر از ۱۰٪ از ایزوله‌های این باکتری در سراسر جهان دارای مقاومت چند دارویی (MDR) بوده اند. هدف از این مطالعه، شناسایی اینتگرون‌های کلاس I در باکتری سودوموناس آئروژینوزای جداشده از ورم پستان با تکنیک‌های ملکولی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن در سویه‌های جداسازی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و جداسازی نمونه‌ها

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، طی ماه فروردین تا شهریور سال ۱۳۹۳، تعداد ۱۵۰ نمونه از شیر خام دامداری‌های نقاط مختلف استان تهران و تعدادی نیز از منطقه شهرکرد با علائم ورم پستان جمع‌آوری و بر روی محیط‌های بلاداگار، مک‌کانکی آگار و استریمیداگار کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. بعد از رشد باکتری نمونه‌ها از نظر وجود پرگنه‌های مشکوک به سودوموناس آئروژینوزا بررسی و با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی ازجمله تست اکسیداز، کاتالاز، تست OF، تست MR/VP، بررسی حرکت و تولید اندول در محیط کشت SIM، تولید پیگمان، واکنش در محیط کشت TSI و رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، شناسایی و در نهایت ۵۱ نمونه باکتری سودوموناس آئروژینوزا مورد تایید قرار گرفت (۳).

آزمون تعیین حساسیت

جهت انجام آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، ابتدا سوسپانسیونی از باکتری که مطابق با استاندارد نیم مک فارلند بود تهیه و با سوآپ بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت HIMEDIA (Himedia Laboratories Pvt.Limited-INDIA) با استفاده از پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده و محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون گردید. بعد از آن قطر هاله عدم رشد و مقاوم و حساس و یا نیمه حساس بودن باکتری با استفاده از جدول استاندارد CLSI مشخص گردید (۵). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: جنتامایسین(۱۰میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، انروفلوکساسین(۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰میکروگرم). جهت بررسی کنترل کیفی آزمایشات از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آزمون تعیین MIC

جهت انجام آزمایش تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC Minimum Inhibitory Concentration) از نوارهای E.test (Epsilometer test) با رقت‌های مختلف بر حسب میکروگرم استفاده گردید. بعد از کشت باکتری با استفاده از سوآپ بر روی محیط مولرهینتون‌آگار، نوارهای E.test آنتی‌بیوتیکهای آمیکاسین، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین تهیه شده از شرکت Himedia Laboratories (HIMEDIA Pvt.Limited-INDIA) با قلم مخصوص بر روی محیط قرار داده و در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA با کیت MBST (Molecular Biological System Transfer) و مطابق دستوالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. آزمون PCR جهت بررسی ژن اینتگرون I با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ ذکرشده است، انجام شد (۱۰). برنامه آزمون PCR بدین صورت می‌باشد: واسرشت اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشت دردمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه (۳۵ سیکل)، بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام گردید. مخلوط ترکیبات استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح می‌باشد: PCR (Cinna KIT-PR۸۲۵۰C) MASTER MIX به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، پرایمرهای مورد استفاده با غلظت ۰,۵ µM هرکدام ۱ میکرولیتر، نمونه DNA ۴ میکرولیتر، آب مقطر ۶/۵ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه و مورد استفاده قرار گرفت(۱۰). آزمون PCR در دستگاه TECHNE انجام و از نشانگر ۱۰۰ bp ladder (Fermentase) نیز برای تایید وزن مولکولی محصولات تکثیر

www.SID.ir

Archive of SID

شـــده، استفاده شـــد. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل ۱/۲٪ آگارز انجام و پس از رنگ آمیزی بـــا اتیدیوم بروماید، نتایج، با دســـتگاه Gel Documentation (BIORAD) زیر نور ماورای بنفش (UV) بررسی و اندازه محصول با طول bp ۵۵۸ مشـــاهده شـــد. در نهایت داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS ۱۳ با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در ایـــن تحقیـــق مشـــخص گردید کـــه از مجموع ۱۵۰ نمونه شـــیر دارای علائم ورم پســـتان در نهایت ۵۱ نمونـــه ۳۴ درصد آلوده به باکتری ســـودوموناس آئروژینوزا می‌باشـــند. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که میزان حساســـیت ســـویه‌های مختلف به آنتی‌بیوتیک‌های مورد اســـتفاده متفاوت بوده که در جدول شماره ۲ ذکر شده است. نتایج حاکی از این بود که ســـودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس هســـتند، ولی بیشـــترین مقاومت نسبت به آمپی‌ســـیلین، تتراسایکلین و کانامایســـین به میزان ۱۰۰ درصد، ۹۴/۲ و ۹۴/۲ درصد به ترتیب مشاهده شد (نمودار ۱). همچنین مطابق جدول ۳ میزان مقاومت چندگانه جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیکهای مختلف با گروه‌بندی مختلف نشان‌دهنده مقاومت بالای چندگانه (MDR) در نمونه‌های شـــیر آلوده به باکتری ســـودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. بیشـــترین مقاومت چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیکهای کانامایســـین/آمپی سیلین/تتراسایکلین مشاهده شـــد. در نمودار ۲ میزان فراوانی مقاومت به ۲، ۳ و ۴ آنتی‌بیوتیک مشـــخص می‌نماید که بیشترین میزان مقاومت نسبت به ۳ و ۴ آنتی‌بیوتیک به طور همزمان به ترتیب ۵۴/۹ درصـــد و ۳۹/۲ درصد و کمترین میزان مقاومت نســـبت به ۲ آنتی‌بیوتیک با ۵/۸ درصد فراوانی وجود داشـــته و هیچ جدایه‌ای که حساس و یا مقاوم به همه داروها باشـــد در بین نمونه‌ها مشاهده نگردید. جهت تعیین حداقل غلظـــت ممانعت از رشـــد MIC با اســـتفاده از E.test، بـــا آنتی‌بیوتیکهای جنتامایسین، سیپروفلوکساســـین و آمیکاسین انجام و مشخص گردید که نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک جنتامایســـین بیـــن µg ۲-۰/۷۵، به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بین µg ۰/۳۸-۰/۰۹۴ و به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین بین µg ۴-۰/۰۵ حساس می‌باشند (شکل ۱). نتایج حاصل از شناسایی مولکولی با استفاده از روش PCR مشخص نمود که تنها ۱ جدایه معادل ۱/۹۶ درصد واجد ژن اینتگرون (int-1) با قطعه‌ای به وزن ۵۵۸ جفت باز می‌باشد که در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشـــخص شـــد که وجود مقاومـــت چندگانه (MDR)

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده برای ژن اینتگرون I (Fonseca et al.,2005)

نام پرایمر	دمای اتصال	Sequence (5´- 3´)	اندازه محصول (bp)
intI-F	۵۵°C	GCCTTGCTGTTCTTCTACGG	۵۵۸
:IntI-R		GATGCCTGCTTGTTCTACGG	

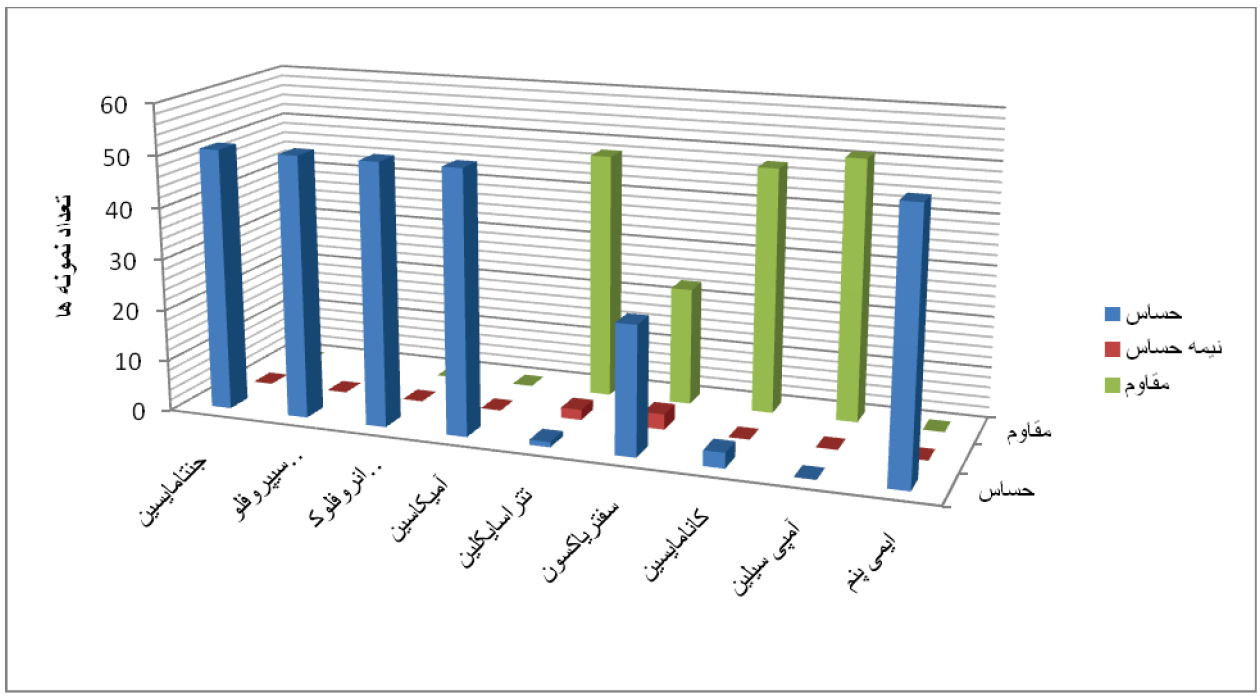
جدول۲- میزان حساسیت سویه‌ها به آنتی بیوتیک‌های مختلف با روش دیسک دیفیوژن بر حسب تعداد و درصد

نوع آنتی بیوتیک	(٪) حساس	(٪) نیمه حساس	(٪) مقاوم
جنتامایسین	۵۱ (۱۰۰)	-	-
سیپروفلوکساسین	۵۱ (۱۰۰)	-	-
انروفلوکساسین	۵۱ (۱۰۰)	-	-
آمیکاسین	۵۱ (۱۰۰)	-	-
تتراسایکلین	۱ (۱/۹)	۲ (۳/۹)	۴۸ (۹۴/۲)
سفتریاکسون	۲۵ (۴۹/۱)	۳ (۵/۸)	۲۳ (۴۵/۱)
کانامایسین	۳ (۵/۸)	-	۴۸ (۹۴/۲)
آمپی سیلین	-	-	۵۱ (۱۰۰)
ایمی پنم	۵۱ (۱۰۰)	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های ورم پستان ناشی از سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند زنگ خطری برای انتقال عوامل مقاومت به جوامع انسانی باشد، همانطور که این باکتری به عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد کننده عفونت‌های مقاوم بیمارستانی مطرح شده است (۲). شجاع پور و همکاران در سال (۱۳۸۷) سودوموناس آئروژینوزا را به عنوان عامل عفونت اصلی بیمارستانی گزارش نموده و تشخیص‌های صحیح آزمایشگاهی را برای جلوگیری از شکست درمان ناشی از انتخاب داروی نامناسب بسیار مهم توصیف می‌نمایند(۲۱). خان در نتایج تحقیق خود که به منظور شناسایی ژن حدت باکتری سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌های محیطی انجام گردید، عنوان نمود که سودوموناس آئروژینوزاهای دارای عوامل حدت را می‌توان از آب شرب حیوانات محصور شده در قفس تا میزان CFU۴۰ شناسایی نمود (۱۴). دیلی و همکاران در ایرلند به بررسی میزان شیوع ورم پستان ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در گله‌های گاوهای شیری به روش ملکولی پرداخته و با انجام کشت ابتدا وجود باکتری را اثبات نموده و اشاره به این نکته نیز می‌نماید که جداسازی از نمونه‌های ورم پستان مزمن به روش کشت بعضاً مشکل می‌باشد (۶). در تانزانیا شم و همکاران در سال (۲۰۰۱)، به بررسی ورم پستان‌های تحت بالینی در بین نژادهای مختلف پرداخته و به این نتیجه رسیدند که میزان ابتلا به باکتری سودوموناس آئروژینوزا از درصد کمتری نسبت به استاف اورئوس و استرپ آگالاکتیه برخوردار است و ۲۰ درصد ورم پستان‌ها را ناشی از این باکتری گزارش



نمودار۱- توزیع فراوانی مقاومت و حساسیت به آنتی بیوتیک های مختلف بر حسب تعداد

جدول ۳- تعداد جدایه‌های دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها مختلف

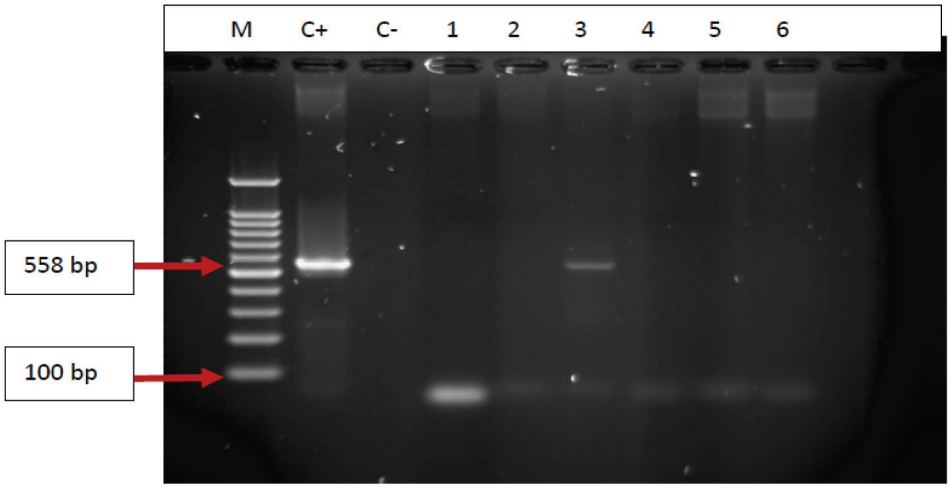
تعداد جدایه‌های مقاوم	نوع آنتی بیوتیک
۲	کاناماپسین/آمپی سیلین/ سفتریاکسون
۲۵	کاناماپسین/آمپی سیلین/تتراسایکلین
۱	کاناماپسین/آمپی سیلین
۲۰	کاناماپسین/آمپی سیلین/ سفتریاکسون/ تتراسایکلین
۲	تتراسایکلین/آمپی سیلین
۱	تتراسایکلین/آمپی سیلین/سفتریاکسون

www.SID.ir

Archive of SID

نمودند (۲۰). جیانگ و همکاران در بررسی خود سال (۲۰۱۵) بر روی ۲۲۷۵۹ نمونه شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان‌های تحت بالینی، میزان آلودگی به سودوموناس آئروژینوزا را ۶۲/۵۵ درصد گزارش نمودند (۱۳). قبولی و همکاران در پژوهش سال (۱۳۹۱) بر روی باکتری‌های ایجادکننده ورم پستان دوره خشکی در تبریز به این نتیجه رسیدند که ۱۳/۳۲ درصد نمونه‌ها آلوده به سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند (۱۱). در تحقیق حاضر نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب نگردید، لیکن بر اساس محل جغرافیایی مشخص گردید که میزان آلودگی شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان‌های با ویژگی‌های تحت بالینی ۳۴ درصد بوده که این میزان فراوانی با توجه به نتایج مطالعات فوق همخوانی نداشته که علت این امر می‌تواند ناشی از منطقه جغرافیایی مورد مطالعه، ضعف مدیریت مزارع، وجود آبهای آلوده و یا مخازن آلوده به این باکتری، تفاوت روش‌های جداسازی و شناسایی باکتری و احتمال بروز خطا در روش‌های شناسایی باشد. به طور کلی گزارش میزان آلودگی و بررسی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و عوامل بیماری‌زای باکتری سودوموناس آئروژینوزا در ایران بسیار کم بوده ولی با توجه به افزایش شیوع و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در درمان بدون انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام می‌تواند نقش مهمی در ایجاد سویه‌های مقاوم ایفا نماید. کیرک و همکاران برنامه مدونی برای کنترل ورم پستان‌های ناشی از سودوموناس آئروژینوزا در گله‌های شیری ارائه می‌کنند. او در این برنامه به عوامل ایجاد کننده و راه‌های کنترل و مهار این عوامل در جهت کاهش ورم پستان ناشی از سودوموناس آئروژینوزا می‌پردازد. وی در این برنامه به انجام مرتب و دوره‌ای کشت نمونه‌های شیر دام‌های دارای علائم، کنترل و آزمایشات میکروبی آب دامداری، اجرای برنامه صحیح بهداشتی اشاره می‌نماید (۱۵). زادوکس و همکاران در سال (۲۰۱۱)، استفاده از محلول

شکل ۱- نتیجه آزمون تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد MIC با استفاده از نوار E.test



شکل ۲- نتیجه RCP بر روی ژل آگارز از چپ به راست: مارکر (100 bp)، کنترل مثبت حاوی ژن (int-1)، کنترل منفی، نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده ۱-۶، چاهک شماره ۳ حاوی نمونه مثبت ژن (int-1) با طول باند (558 bp)

www.SID.ir

Archive of SID

کلرهگزیدین را در ضدعفونی سرپستان‌ها در کاهش میزان ابتلا موثر می‌داند (۲۳). سودوموناس آئروژینوزا از جمله باکتری‌های مقاوم است که به دلیل کاهش نفوذپذیری دارو و تولید آنزیم‌های مختلف، دارای مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (۱۲). تیله و همکاران در سال (۲۰۰۳)، بررسی بر روی میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی عوامل ایجاد کننده ورم پستان در گله گاوهای شیری را انجام داده و میزان مقاومت باکتری سودوموناس آئروژینوزا جداشده از ورم پستان گاوهای مبتلا را که دارای سنین مختلف بودند گزارش نمودند. در نتایج تیله میزان مقاومت باکتری سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، تتراسایکلین، انروفلوکساسین، تری‌متوپریم/سولفانامید، سفوپرازون و استرپتومایسین بین سالهای ۲۰۰۳-۱۹۹۹ به ترتیب برابر با ۹۴ درصد، ۹۳ درصد، ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد، ۹۶ درصد اعلام شد (۲۲). قبولی در نتایج تحقیق خود بیشترین میزان مقاومت را نسبت به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین گزارش نمودند (۱۱). در پژوهش اخیر نیز میزان مقاومت مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین، تتراسایکلین و کانامایسین به میزان ۱۰۰ درصد، ۹۴/۲ و ۹۴/۲ درصد به ترتیب گزارش گردید که با نتایج تحقیقات تیله همخوانی دارد. در تحقیق ما همچنین میزان فراوانی وجود مقاومت‌های چندگانه دارویی (به ۲ دارو، ۳ و ۴ دارو) نشان داد که با بروز پدیده (MDR) روند درمان عفونتهای ورم پستان ناشی از سودوموناس آئروژینوزا به مرور مشکل‌تر خواهد شد و با انتقال عوامل مقاومت سویه‌های مقاوم بیشتری پدید خواهد آمد. مصرف بیش از اندازه آنتی‌بیوتیک در دامپزشکی و حضور این ترکیبات در محصولات غذایی حیوانی که مورد مصرف جوامع انسانی می‌باشد باعث ظهور سویه‌هایی مقاوم از سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چندگانه شده است و آن را به یک مشکل اپیدمیولوژیک بزرگ در سرتاسر جهان تبدیل نموده است (۷).

اینتگرون‌ها به عنوان عناصر متحرک ژنتیکی موجب انتقال شاخص‌های مقاومت ضدمیکروبی در میزان بالا شده و از اهمیت زیادی در ایجاد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی به خصوص در باکتری‌های گرم منفی برخوردار هستند (۱۹). انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از طریق اینتگرون‌ها باعث افزایش مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا نسبت به ترکیبات ضد میکروبی شده است (۹). اینتگرون‌های کلاس I رایج ترین نوع اینتگرون‌های یافت شده در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا می‌باشند، در تحقیق بینگ میزان شیوع اینتگرون‌های کلاس I، ۴۰/۸ درصد و در مطالعه فونسکا، ۴۱/۵ درصد در نمونه‌های بالینی بیماران بستری گزارش شده است (۱۲،۱۰). شیوع اینتگرون کلاس I در مطالعه حاضر برابر با ۱/۹۶ درصد بوده است. البته با مقایسه نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام این تحقیق و شناسایی ژن اینتگرون می‌توان گفت که با توجه به حساس بودن باکتری به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه، فراوانی کم ژن اینتگرون کلاس I در این مطالعه امری نامحتمل نمی‌باشد و همچنین بروز اشکال در انجام آزمون‌های ملکولی و تفاوت در میزان استفاده از مواد ضد میکروبی در درمان انسان ها و حیوانات نیز از دیگر دلایل وجود اختلاف می‌باشد. جهت کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باید ۲ فاکتور عمده یعنی استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت گسترش ژن مقاومت را در نظر داشت. اساس درمان مناسب در عفونت‌های ورم پستان انتخاب یک آنتی‌بیوتیک با کارآئی بالا و ارزان می‌باشد. اقدامات کنترل عفونت و رعایت نکات بهداشتی در حذف یا کاهش این نوع سویه ها بویژه در دامداری‌ها باید بسیار جدی گرفته شود. امروزه افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی رویه و روزافزون داروهاست و متأسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. همچنین استفاده از نتایج تست آنتی‌بیوگرام در درمان عفونت‌های ورم پستانی جهت کاربرد صحیح آنتی‌بیوتیک موثر می‌بایست توجه ویژه‌ای صورت گیرد. از آنجا که بیشتر اینتگرون‌های حاوی ژن‌ها و آنزیم‌های تغیر دهنده آنتی‌بیوتیکها را کد می‌کنند، درمان عفونت ناشی از باکتری سودوموناس آئروژینوزا حاوی این ژن‌ها به دلیل فقدان آنتی‌بیوتیک جدید که طیف درمان وسیعی داشته باشد، مشکلات عمده‌ای را ایجاد می‌کند. لذا شناسایی و ردیابی سویه‌های مولد این آنزیم‌ها می‌تواند گامی اساسی در درمان عفونت ناشی از این سویه‌ها باشد. همچنین با تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مناسب در مواقعی که نیاز به درمان باشد نیز می‌تواند از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری نموده و از انتشار سویه‌های مقاوم در بین جمعیت‌های انسانی و حیوانی ممانعت کرد.

تشکر وقدردانی

این تحقیق با استفاده از بودجه طرحهای تحقیقاتی شماره ۷۵۰۴۰۰۲/۶/۲۰ معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفته است که نویسندگان مراتب سپاس خود را بدین وسیله اعلام می دارند. همچنین از همکاری دکتر ایرج اشرافی تمای، مهندس امیر مهربانی و آزمایشگاه پژوهشی میکروبیولوژی پاسارگاد که در انجام مراحل عملی این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Aertsen, A., K. Vanoirbeek, et al. (2004). Heat shock protein-mediated resistance to high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*; *Appl Environ Microbiol*; 70(5): 2660-2666.

2- Aslani MM. Hashemipour M. Nikbin NS, S. F., Eidi A, Sharafi Z. (2009). Molecular detection and identification of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from wound infections and burns; *J Lorestan Uni Med Sci*; 11(2): 23-29.

3- Brooks, G. F., J. S. Butel, et al. (2005). Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology; New York, NY, McGraw-Hill.

4- Champagne, C. P., R. R. Laing, et al. (1994). Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control; *Crit Rev Food Sci Nutr;* 34(1): 1-30.

5- Cockerill, F. R., Clinical, et al. (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement; provides updated tables for M02-A11 and M07-A9, National Committee for Clinical Laboratory Standards.

6- Daly, M., E. Power, et al. (1999). Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds; *Appl Environ Microbiol;* 65(6): 2723-

www.SID.ir

Archive of SID

2729.

7- Dubois, V., C. Arpin, et al. (2002). Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a blaTEM-21 gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon; *Antimicrob Agents Chemother*; 46(11): 3624-3626.

8- Fluit, A. and F. Schmitz (1999). Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology; *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 18(11): 761-770.

9- Fluit, A. and F. J. Schmitz (2004). Resistance integrons and super-integrons; *Clin Microbiol Infect*; 10(4): 272-288.

10- Fonseca, É. L., V. V. Vieira, et al. (2005). Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brazil; *FEMS Immunol Med Microbiol*; 44(3): 303-309.

11- Ghaboli Mehrbani R, M. S., Khakpour M (2012). Assess the antibiotic susceptibility of bacteria causing mastitis in dairy cows dry period in Tabriz; *J Vet Res Lab;* 4(1): 140.

12- Gu, B., M. Tong, et al. (2007). Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and Acinetobacter baumannii isolates from patients in Nanjing, China; *J Clin Microbiol;* 45(1): 241-243.

13- Jiang, Q., Y. Yang, et al. (2015). Microbial diversity analysis of subclinical mastitis in dairy cattle in Northeast China; *African J Microbiol Res;* 9(10): 687-694.

14- Khan, A. A. and C. E. Cerniglia (1994). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR; *Appl Environ Microbiol;* 60(10): 3: 739-745.

15- Kirk, J. and R. Mellenberger (1987). Pseudomonas-infected dairy cows; Extension bulletin E-Cooperative Extension Service.

16- Kong, K.-F., S. R. Jayawardena, et al. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB β-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors; *Antimicrob Agents Chemother:* 49(11): 4567-4575.

17- Nazik, H., B. Ongen, et al. (2007). Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients; *Jpn J Infect Dis;* 60(2/3): 82.

18- Resmini, P., Pellegrino, L., & Battelli, G. (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method; *Ital J Food Sci;* 2(3), 173-183.

19- Rowe-Magnus, D. A. and D. Mazel. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture; *Inter J Medl Microbiol*; 292(2): 115-125.

20- Shem, M., J. Malole, et al. (2001). Incidence and causes of subclinical mastitis in dairy cows on smallholder and large scale farms in tropical areas of Tanzania; *Asian Australas J Anim Sci;* 14(3): 372-377.

21- Shojapour M, V. M., Shariati L, Karimi A, Zamanzad B. (2011). Determination of antibiotic resistance and check-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens Kashani and Hajar hospitals in 1387; *South Med J;* 14(2): 99-94.

22- Teale, C., P. Martin, J. Rogers, and Mars, A. (2004). VLA Antimicrobial Sensitivity Report.2003; HMSO: 23-24.

23- Zadoks, R. N., J. R. Middleton, et al. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans; *J Mamm Gland Biol Neoplasia*; 16(4): 357-372.

24- Zeighami H, H. F., Hajiahmadi F (2013). The role of integrons in the development of antibiotic resistance; *Lab Diagn;* 92: 61-71.

www.SID.ir