بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتریهای جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان

● دکتر عبداله حسین خان ناظر
استادگروه بهداشت و کنترل مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

● دکتر افشین زاهدی
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

چکیده
در این بررسی میزان شیوع بیماری ورم پستان، الگوهای مختلف مقاومتهای آنتی بیوتیکی ونیز تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های مقاوم به آنتی بیوتیکهای پنی سیلین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین و سفالکسین در باکتریهای مولد ورم پستان در گوسفندان شیری انجام گرفت. در انجام این تحقیق تعداد ۵۱۰ راس گوسفند شیری که بیش از دو هفته از زایش آنها گذشته بود از بین ۱۴گله مختلف از اطراف شیراز انتخاب شدند و تعداد ۱۰۲۰ نمونه شیر تهیه و به آزمایشگاه آورده شد. میزان شیوع ورم پستان بالینی و تحت بالینی به ترتیب ۰/۳۹ و ۱۹/۱۰ در صد بود.از کل ۱۶۲ باکتری جدا شده، ۵۱/۸ درصد استافیلوکوک کواگولازمنفی، ۲۵/۹ درصد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک، ۹/۳ درصد استافیلوکوک آرئوس، ۵/۶ درصد باسیلوس سرئوس، ۳ درصد کلبسیلا جدا گردیدند. در آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی بین ۱۱/۹ درصد (استرپتوکوک آلفاهمولتیک) و ۱۰۰ درصد (سود ومونازآیروجنوزا) از باکتریهای جداشده به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. از دو روش کاپیلری و اسیدومتری برای آزمایش باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز استفاده گردید که روش کاپیلری و اسیدومتری بترتیب قادر به تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در ۸۵/۱۸ درصد و ۶۲/۹۶ درصد از موارد بودند.

مقدمه

رونـد رو بـه رشـد جـمعیت در جـهان امـروزی بـخصوص در کشـورهای در حـال تـوسعه، تـقاضا بـرای منابع غذائی بویژه مواد پروتئینی را بالا برده است و بشررا به تکاپو واداشته تا به هر نحو ممکن با افزایش تولید، جوابگوی میزان تقاضا باشد. یکی از این راهها مبارزه با بیماریهائی است که سبب کاهش منابع پروتئینی میگردد. یکی از این بیماریها ورم پستان در گوسفندان می‌باشد.

اغلب محققین، تورم پستان را به دلیل حذف قیل از بلوغ میشهای با پستانهای غیر طبیعی و به علت کاهش پرستاری از برهها توسط میشهای مبتلا به ورم پستان و کاهش تولید شیر که به کاهش رشد برهها منجر می‌شود، به عنوان یکی از مهمترین بیماریهای گوسفندان بحساب می‌آورند. در تحقیقی توسط Fthenakis, Jones در سال ۱۹۹۰ نشان داده شد که میشهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی بیش از ۳۷ درصد کاهش تولید شیر و برههائی که از شیر میشهای مبتلا مصرف می‌کردند بیش از ۳۰ درصد کاهش وزن داشتند. باتوجه به این موضوع فراهم آوردن مهمترین روشهای اقتصادی تشخیص و درمان برای دامها و بازگرداندن آنها به مرحله تولید اقتصادی و نیز ارائه برنامه‌های کنترل موثر از جمله مسائلی است که باید مورد توجه قرار گیرد. یکی از روشهای موثر برای کنترل تورم پستان استفاده از آنتی‌بیوتیکها است که بطور وسیع بیش از ۳۰ سال است که مورد استفاده بوده و اکنون نیز به عنوان یک عامل اجتناب ناپذیر در درمان و کنترل ورم پستان محسوب میگردد. متأسفانه این استفاده وسیع و بخصوص در مواردی که بطور نامناسب مصرف میگردد، منجر به گسترش سویه‌های مقاوم باکتری در برابر آنتی‌بیوتیکها گردیده است. در تحقیقی، ۷۰ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از ورم پستان نسبت به پنی‌سیلین مقاوم گزارش شد (۵).

یکی از راههای مقابله میکروارگانیسم‌ها در برابر ترکیبات پنی‌سیلین تولید آنزیم بتالاکتاماز میباشد. این آنزیم با هیدرولیز کردن حلقه بتالاکتام موجود در آنتی بیوتیکهای خانواده بتالاکتام که یکی از مهمترین ترکیبات موثر غلبه میکروارگانیزمهای گرم مثبت و منفی می‌باشد باعث بروز مقاومت نسبت به این داروها می‌گردد. بنابراین تعیین میزان مقاومت ایجاد شده ناشی از تولید این آنزیم در باکتریهای مولد ورم پستان به نوبه خود گام موثری در جهت ارائه الگوی مناسبتری جهت استفاده از آنتی بیوتیکهای مختلف برای درمان و کنترل این بیماری خواهد بود. لذا اهداف این تحقیق را میتوان بطور خلاصه و بصورت ذیل بیان داشت:

الف - شناسائی گوسفندان شیری مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گوسفندارهای اطراف شیراز به روش C.M.T. (California mast. tis test)

ب- تعیین و جداسازی عوامل باکتریائی (هوازی) ایجاد کننده ورم پستان

ج - تعیین حساسیت باکتریهای جدا شده در برابر آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، سفالکسین، استرپتومایسین، تتراسیکلین، کلرامفنیکل، جنتامایسین و نالیدیکسیک اسید.

د- تعیین تولید آنزیم بتالاکتاماز در سویه‌های مقاوم به پنی سیلین و آموکسی سیلین و سفالکسین.

مواد و روشها

نمونه گیری

بعد از اینکه پستان گوسفندان شسته و خشک می‌شد به وسیله پنبه آغشته به الکل، سرپستانک به طور کامل ضد عفونی شده و ابتدا چند دو شش اولیه را دور ریخته و سپس مقدار ۱۰ سی‌سی در شیشه درب‌دار

استریل جمع آوری و در کنار یخ نمونه‌ها به دانشکده حمل می‌شد. روش C.M.T. بر روی هر نمونه شیر بر توصیه و دستورالعمل (American Public Health Association 1974) انجام می‌گرفت (۱).

در زمانی که هر گوسفند مورد آزمایش C.M.T. قرار میگرفت علائم بالینی نظیر قرمزی پوست پستان، سفت بودن نسج پستان و یا دیگر علائم ثبت میگردید.اگر پستان دام گرم، قرمز و دردناک بود، ورم پستان بالینی مورد نظر قرار می‌گرفت.

نمونه‌هائی که بر اساس آزمایش C.M.T. مثبت تشخیص داده میشدند مورد آزمایش باکتریولوژی قرار میگرفتند. جداسازی و تشخیص گونه‌های مختلف باکتریها برطبق روشهای (۱۹۷۴) Cowan و Steel، (۱۹۷۲) Edwards and Ewing، (۱۹۹۰) Baron and Finegold (۹، ۷ و ۳) انجام پذیرفت.

آزمایش آنتی‌بیوگرام

جهت آزمایش حساسیت ابتدا گونه‌های باکتریهای مختلف جدا شده را در محیط آبگوشت (Tryptone Soya Broth Oxoid CM 129) T.S.B. کشت داده و پس از ۶ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد برروی محیط آگار (Diagnostic Sensitvity Test Agar oxoid CM 261)D.S.T. گسترده و سپس بر روی هر محیط از دیسکهای آنتی‌بیوتیکی ذیل قرار داده می‌شد:
Penicillin (P-10 i.u.), Ampicillin (Am-25ug), Amoxicillin (Amo-25ug), Tetracycline (Te.50ug), Streptomycin (St-25ug), Cephalexin (Ce-30ug), Gentamycin (G-10ug), Chloramphenicol (Chl-50ug), Nalidixic acid (Na-30ug).

روش استاندارد Beaur و همکاران (۱۹۶۶) بر اساس قطر هاله حساسیت در اطراف دیسکها به کار گرفته شد (۴). در این مطالعه گونه هائی از باکترنهای خانواده آنتروباکتریاسه که مقاومت به دیسکهای آنتی‌بیوتیک را نشان داده بودند جهت مطالعه فاکتور R بکار گرفته شدند.

انتقال فاکتور R بر اساس روشی که قبلاً توسط ناظر در سال ۱۹۸۰ توصیف گردیده انجام گرفت (۱۴).

روش تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز

آنزیم بتالاکتامازدر گونه‌های باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام به دو روش کاپیلری (Rosen همکاران ۱۹۷۲) و اسیدومتری (Sng و همکاران ۱۹۸۰) انجام پذیرفت (۱۸ و ۲۰).

نتایج

در این بررسی تعداد ۵۱۰ راس گوسفند شیری که حدوداً دو هفته از زایمان آنها گذشته بود مورد مطالعه قرار گرفتند. از تعداد کل ۵۱۰ راس گوسفند ۹۸ راس (۱۹/۲۱درصد) مبتلا به فرم تحت بالینی و ۲ راس (۰/۳۹ درصد) مبتلا به فرم بالینی ورم پستان بودند.

در این مطالعه شیر کارتیه‌هائی که از نظر C.M.T. مثبت تشخیص داده شده بودند از نظر باکتریولوژی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. از تعداد ۱۶۲ باکتری جدا شده ۸۴ سویه (۵۱/۸ درصد) استافیلوکوکهای کواگولاز منفی، ۴۲ سویه (۲۵/۹ درصد) استرپتوکوکهای آلفاهمولتیک، ۱۵ سویه (۹/۳درصد) استافیلوکوکوس آرئوس، ۹ سویه (۵/۶ درصد) باسیلوس سرئوس، ۴ سویه (۲/۵ درصد) سودوموناز آیروجنوزا، ۵ سویه (۳ درصد) اشرشیاکلی و ۳ سویه (۱/۹ درصد) کلبسیلا شناسائی گردید (جدول ۱). تست حساسیت نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک نشان داد که از ۱۵۸ سویه باکتری جدا شده از شیر پستان مبتلا (فرم ورم پستان تحت بالینی)، ۳۰ سویه (۱۸/۹۸ درصد) و از ۴ سویه باکتری جداشده از شیر پستان مبتلا به فرم بالینی، ۱ سویه مقاوم بودند (جدول ۲). از ۱۶۲ مورد باکتری ۱۸ مورد (۱۱/۱ درصد) نسبت به Penicillin، ۵ مورد (۳/۰۸ درصد) نسبت به Ampicillin، ۶ مورد (۳/۶ درصد) نسبت به Amoxicillin، ۱۰ مورد (۶/۱ درصد) نسبت به Cephalexin،۶ مورد (۳/۶ درصد) نسبت به Streptomcin، ۴ مورد (۳/۴ درصد) نسبت به Tetrayclin،۴ مورد (۲/۴درصد) Chloramlph-enicol و ۱۲ مورد (۷/۴ درصد) نسبت به Nalidixic acid مقاومت نشان دادند. در حالیکه همه باکتریهای فوق نسبت به Gentamycin حساس بودند (جدول ۳).

در این بررسی ۱۶ نوع الگوی مختلف آنتی‌بیوتیک بدست آمد (جدول ۴).

باکتریهای با الگوی مقاومت ساده، بیشترین میزان را در این بررسی به خود اختصاص دادند و هر چه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی پیچیده‌تر میشد میزان آن نیز کمتر میشد. بطوریکه از ۳۱ مورد باکتری مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش ۱۵ مورد (۹/۲ درصد) الگوی مقاومت یگانه، ۵ مورد(۳/۰۸ درصد) الگوی مقاومت دوگانه، ۶ مورد (۳/۷ درصد) الگوی مقاومت سه گانه، ۳ مورد (۱/۸ درصد) الگوی مقاومت چهارگانه و ۱ مورد (۰/۶ درصد) دارای الگوی مقاومت پنجگانه و شش گانه بودند (جدول ۵).

همچنین برروی تعداد ۳ سویه مقاوم اشریشیاکلی و کلبسیلا از نظر انتقال فاکتور R آزمایش بعمل آمد و مشاهده شد که تمام سویه‌ها قادر به انتقال تمام و یا قسمتی از فاکتور به کویه آزمایشگاهی *E. coli* - K12 بودند.از۳۷ مورد باکتری مقاوم به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام جدا شده از شیر دامهای مبتلا به ورم پستان ۲۷ مورد (۷۲/۹۷ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز

جدول ۱: میزان شیوع ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گوسفندان.

گله	محل دامداری	تورم پستان تحت بالینی				تعداد گوسفندان
		گوسفندان		کارتیه‌ها		
	مراجعه شده	آزمایش‌شده	CMT(+)	آزمایش‌شده	CMT(+)	مبتلا به ورم پستان بالینی
۱	باجگاه	۳۲	۶	۶۴	۹	—
۲	باجگاه	۴۶	۹	۹۲	۱۶	—
۳	باجگاه	۴۶	۸	۹۲	۱۲	۱
۴	دودج	۳۵	۷	۷۰	۱۰	—
۵	دودج	۲۷	۶	۵۴	۸	—
۶	اطراف زرقان	۴۵	۸	۹۰	۱۳	—
۷	حسین‌آباد	۳۲	۶	۶۴	۱۰	—
۸	حسین‌آباد	۳۷	۷	۷۴	۱۲	—
۹	جاده کشتارگاه	۴۵	۹	۹۰	۱۲	—
۱۰	جاده کشتارگاه	۳۴	۵	۶۸	۱۱	۱
۱۱	کوربال	۲۵	۵	۵۰	۹	—
۱۲	کوربال	۵۰	۱۰	۱۰۰	۱۸	—
۱۳	سلطان آباد	۴۳	۹	۸۶	۱۴	—
۱۴	سعدی	۱۳	۳	۲۶	۳	—
	جمع	۵۱۰	۹۸(۱۹/۲۱٪)	۱۰۲۰	۱۵۸(۱۵/۴۹٪)	۲(۰/۳۹٪)

جدول ۲: مقاومت دارویی باکتریهای عامل ورم پستان جدا شده از نمونه‌های شیر.

نوع باکتری	ورم پستان تحت بالینی		ورم پستان بالینی	
	مواردجداشده	مقاومت	مواردجداشده	مقاومت
استافیلوکوک‌کواگولاز منفی	۸۳	۱۳ (۱۵/۴۸٪)	۱	—
استرپتوکوک آلفا همولتیک	۴۲	۵ (۱۱/۹٪)	—	—
استافیلوکوکوس آرئوس	۱۲	۲ (۱۶/۶٪)	۳	۱ (۳۳/۳٪)
باسیلوس سرئوس	۹	۳ (۳۳/۲٪)	—	—
اشریشیاکلی	۵	۲ (۴۰٪)	—	—
سودوموناس آیروجنوزا	۴	۴ (۱۰۰٪)	—	—
کلبسیلا	۳	۱ (۳۳/۴٪)	—	—
جمع	۱۵۸	۳۰ (۱۸/۹٪)	۴	۱ (۲۵٪)

جدول ۳: نتایج حاصل از آزمایش حساسیت نسبت به ۹ آنتی‌بیوتیک در باکتریهای جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان.

نوع باکتری	استافیلوکوک کواگولاز منفی (۸۴ سویه جدا شده)		استرپتوکوک آلفا همولتیک (۴۲ سویه جدا شده)		استافیلوکوک آرئوس (۱۵ سویه جدا شده		باسیلوس سرئوس (۹ سویه جدا شده)		اشریشیاکلی (۵ سویه جدا شده)		سودوموناز آیروجنوزا (۴ سویه جدا شده)		کلبسیلا (۳ سویه جدا شده)		جمع سویه جدا شده (۱۶۲)	
نوع آنتی‌بیوتیک	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد	مورد	درصد
	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
پنی‌سیلین	۵	۵/۹	۳	۷/۱	۲	۱۳/۳	۲	۲۲/۲	۲	۴۰	۳	۷۵	۱	۳۳/۳	۱۸	۱۱/۱
آمپی‌سیلین	۲	۲/۳	۱	۲/۳	۰	۰	۱	۱۱/۱	۰	۰	۱	۲۵	۰	۰	۵	۳/۰۸
آموکسی‌سیلین	۲	۲/۳	۱	۲/۳	۰	۰	۱	۱۱/۱	۰	۰	۲	۵۰	۰	۰	۶	۳/۶
سفالکسین	۴	۴/۷	۰	۰	۰	۰	۲	۲۲/۲	۱	۲۰	۲	۵۰	۱	۳۳/۳	۱۰	۶/۱۱
استرپتومایسین	۱	۱۱/۱	۱	۲/۳	۱	۶/۶	۱	۱۱/۱	۰	۰	۲	۵۰	۰	۰	۶	۳/۶
تتراسایکلین	۲	۲/۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲۰	۱	۲۵	۰	۰	۴	۲/۴
کلرامفنیکل	۲	۲/۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲۰	۱	۲۵	۰	۰	۴	۲/۴
جنتامایسین	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نالیدیکسیک اسید	۴	۴/۷	۲	۴/۷	۱	۶/۶	۲	۲۲/۲	۰	۰	۳	۷۵	۰	۰	۱۲	۷/۴

بودند که ۲۳ مورد (۸۵/۱۸ درصد) بروش کاپیلری و ۱۷ مورد (۶۲/۶۹ درصد) بروش اسیدومتری پاسخ مثبت نشان دادند (جدول ۶).

بحث

دراین بررسی مجموعاً ۵۱۰ رأس گوسفند شیری که حدود دو هفته از بره زائی آنها گذشته بود به روش CMT از نظر ابتلا به بیماری ورم پستان مورد آزمایش قرار گرفتند که از این تعداد ۹۸ رأس (۱۹/۲۱ رأس) مبتلا به تورم پستان تحت بالینی و ۲ رأس (۰/۳۹ درصد) مبتلا به فرم بالینی تورم پستان و ۴۱۰ رأس (۸۰/۴ درصد) غیرآلوده بودند. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که شیوع تورم پستان در گوسفندارپهای اطراف شیراز در مقایسه با گاوداریهای اطراف شیراز درصد پائینی را نشان می‌دهد (۱۵).

علل پائین بودن ورم پستان در این منطقه را می‌توان به عواملی از قبیل غیرصنعتی بودن گوسفندداریها، متراکم نبودن گوسفندان در یک منطقه و عدم استفاده دامداران از ماشینهای شیردوشی مربوط دانست. طی تحقیقی که در سال ۱۹۹۱ در بخش کالج سلطنتی انگلستان انجام گرفت میزان ورم پستان تحت بالینی و بالینی گوسفندان به ترتیب ۳۱-۱۰ درصد و ۲۴-۰ درصد گزارش شد Watkins و همکاران نیز در سال ۱۹۹۱ میزان ورم پستان تحت بالینی گوسفندان را در جنوب انگلستان ۱۱/۷ درصد ذکر کردند (۲۱).

در مطالعه اخیر از تعداد ۱۶۲ نمونه شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان، ارگانیسمهای جدا شده شامل: استافیلوکوک‌کواگولازمنفی ۸۴ سویه (۵۱/۸ درصد)، استرپتوکوک آلفاهمولتیک ۴۲ سویه (۲۵/۹ درصد)، استافیلوکوس آرئوس ۱۵ سویه (۹/۳ درصد)، باسیلوس سرئوس ۹ سویه (۵/۶ درصد)، اشریشیاکلی ۵ سویه (۳ درصد)، سودوموناز آیروجنوزا ۴ سویه (۲/۵ درصد)، کلبسیلا ۳ سویه (۱/۹ درصد) بود (جدول ۱). با توجه به این نتایج استافیلوکوکهای کواگولاز منفی و استرپتوکوک‌آلفا همولتیک را می‌توان به‌عنوان رایجترین عوامل ورم پستان تحت بالینی در گوسفندان محسوب داشت. منابع مهم این دو سویه باکتری در گوسفندان شیری غدد پستانی، مجاری پستانی، پوست پستان و ضایعات آلوده روی سرپستان می‌باشد.

Watkins و همکاران در سال ۱۹۹۱ باکتریهای غالب در نمونه‌های شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی را استرپتوکوک و استافیلوکوک‌کواگولاز منفی ذکر کردند. در مطالعه‌ای که در سالهای اخیر در بخش بهداشت کالج سلطنتی انگلستان انجام گرفت نیز میزان استافیلوکوکهای کواگولاز منفی جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، بیش از ۵۰ درصد ذکر شد که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. همچنین طی تحقیقاتی که توسط Fthenakis, Jones در سال ۱۹۹۰ انجام شد استافیلوکوکهای کواگولاز منفی به عنوان عامل اصلی ایجاد ورم پستان تحت بالینی شناخته شدند (۱۱).

در این بررسی تعداد ۱۵ سویه (۹/۳ درصد) استافیلوکوکوس آرئوس جدا گردید. این باکتری یکی از عوامل اصلی ورم پستان بالینی می‌باشد.

پائین بودن میزان ورم پستان بالینی در این تحقیق، را می‌توان به عنوان دلیلی بر پائین بودن درصد استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده دانست Watkins و همکاران در سال ۱۹۹۱ میزان استافیلوکوکوس آرئوس جدا شده از نمونه‌های شیر گوسفندان مبتلا به تورم پستان تحت بالینی ۸۱٪ ذکر کردند که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

طبق نتایج حاصل از آزمایش حساسیت بر روی باکتریهای مولد تورم پستان در این بررسی از ۸۴ سویه استافیلوکوک‌کواگولاز منفی جدا شده، ۱۳ سویه نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند که بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۵/۹ درصد)، نالیدیکسیک اسید، سفالکسین هر کدام (۴/۷ درصد)، آمپی‌سیلین، تتراسیکلین، آموکسی‌سیلین و کلرامفنیکل هر کدام (۲/۳ درصد) و استرپتومایسین (۱/۱ درصد) بود.

در مورد استافیلوکوکوس آرئوس نیز از ۱۵ سویه جدا شده ۳ سویه نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند که بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۱۳/۳ درصد) و به دنبال آن نالیدیکسیک اسید و استرپتومایسین هر کدام (۶/۶ درصد) بود. علت مقاومت بالای سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس نسبت به پنی‌سیلین را می‌توان استفاده وسیع این آنتی‌بیوتیک در درمان ورم پستان و سایر بیماریهای عفونی دیگر دانست. همچنین تولید آنزیم بتالاکتاماز مکانیسم مهمی در ایجاد مقاومت نسبت به داروهای خانواده بتالاکتام در این باکتریها می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق ۷۲/۸ درصد از سویه‌های استافیلوکوک‌کواگولاز منفی و ۵۰ درصد از سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند که قاعدتاً میزان مقاومت بالاتر این باکتریها بخصوص استافیلوکوک‌کواگولاز منفی به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام قابل توجیه می‌باشد. در بررسی که توسط Matsonaga ژاپن انجام گرفت وی نیز میزان آنزیم بتالاکتاماز را در باکتریهای استافیلوکوک‌کواگولاز منفی (۷۲/۷ درصد) و بیشتر از سویه‌های استافیلوکوکوس آرئوس گزارش نمود. سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس همچنین به آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین و تتراسیکلین دارای درجات مختلفی از مقاومت بودند که در مورد استرپتومایسین به خاطر استفاده توأم استرپتومایسین و پنی‌سیلین در درمان ورم پستان و در مورد تتراسایکلین به علت استفاده درمانی این آنتی‌بیوتیک در بیماریها می‌باشد.

در این بررسی هیچکدام از ۱۶۲ باکتری جدا شده نسبت به جنتامایسین مقاومتی از خود نشان ندادند. میتوان دلیل آنرا استفاده ناچیز این آنتی‌بیوتیک در حیوانات، قدرت بالای آنتی‌بیوتیکی آن و اینکه مقاومت به جنتامایسین بواسطه جهش و به آهستگی و در طی چند مرحله بروز میکند، دانست (۸). در این تحقیق همچنین سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس نسبت به نالیدیکسیک اسید نیز مقاومت نشان دادند که بانتایج تحقیق ناظر و توکلی در سال ۱۹۹۴ برروی عوامل باکتریائی ورم پستان در گاو مطابقت دارد (۱۵). باتوجه به اینکه این آنتی‌بیوتیک در گاو و گوسفند مصرفی ندارد این میزان مقاومت را میتوان حاصل منابع دیگری بخصوص انتقال باکتریهای مقاوم از مرغداریها دانست. در مرغداریها از آنتی‌بیوتیکی بنام فلومکوئین به طور وسیعی استفاده می‌گردد و این دو آنتی‌بیوتیک از لحاظ ساختمانی شباهت زیادی به یکدیکر دارند. در واقع این مقاومت میتواند ناشی از انتقال باکتریهای مقاوم به فلومکوئین به محیط گوسفندداری باشد، همچنین شیوع مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک

باتوجه به اینکه مقاومت در برابر این دارو سریعاً ایجاد میشود، بیشتر توجیه می‌گردد. مقاومت نسبتاً بالای استافیلوکوک کواگولاز منفی نسبت به آمپی سیلین و آموکسی‌سیلین با توجه به اینکه مصرف این آنتی بیوتیکها در حیوانات در حد پائینی است دال برگسترش بالای باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز در طبیعت است.

در مورد استرپتوکوک نیز از ۴۲ سویه جدا شده ۵ سویه نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند که بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۷/۱ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیکهای آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و استرپتومایسین هر کدام با ۲/۳ درصد بود.

از بین ۴ سویه جداشده در این بررسی همگی (۱۰۰ درصد) به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. دلیل مقاومت بالای این باکتری نسبت به

جدول ۴: انواع الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریهای جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان

یگانه و مضاعف	سه‌گانه، چهارگانه، پنج‌گانه و شش‌گانه
Pen.S	Pen. Am. Amz. Ce .S. Na
Pen. Na	Pen. Am. Ce. S. Na.
Pen. Ce	Pen. Ce. Te. Na.
Te. Chl.	Pen. Ce. Te. Chl.
Pen.	Pen. Amx. S.
Na	Pen. Ce. Na.
Ce	
Te	
Am.	
Amx.	

Pen. Penicillin S. Streptomycin
Am. Ampicillin Chl. Chloramphenicol
Amx.Amoxicillin Te. Tetracycline
Ce. Cephalexin Na. Nalidixic acid

آنتی‌بیوتیکهای مورد استفاده، مربوط به ساختمان خاص دیواره سلولی این باکتری میباشد که براحتی به آنتی‌بیوتیکها اجازه عبور نمی‌دهد.

از ۹ سویه باسیلوس سرئوس جدا شده در این تحقیق، ۳ سویه (۳۳/۳ درصد) به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادندکه بیشترین مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، سفالکسین و نالیدیکسیک اسید که هر کدام با ۲۲/۲ درصد وکمترین مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی سیلین و استرپتومایسین هر کدام با ۱۱/۱ درصد بود.

باتوجه به اینکه این باکتری قادر به زنده‌ماندن در پمادهای پستانی حاوی آنتی‌بیوتیک میباشد بنابراین باید درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالائی را برای آن انتظار داشت (۱۳).

از ۵ سویه اشریشیاکلی جدا شده، ۲ سویه (۴۰درصد) و از ۳ سویه کلبسیلا جدا شده، ۱ سویه (۲۳/۴ درصد) مقاومت نشان دادند. سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده بیشترین مقاومت را نسبت به پنی‌سیلین (۴۰ درصد) و سپس به سفالکسین، تتراسیکلین و کلرامفنیکل هر کدام (۲۰ درصد) نشان دادند و سویه‌های کلبسیلا نسبت به پنی‌سیلین و سفالکسین هر کدام (۳۳/۳ درصد) مقاوم بودند. ناظر و توکلی در سال ۱۹۹۴ مقاومت اشریشیلاکلی و کلبسیلا جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به تورم پستان را در برابر پنی سیلین ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۱۵). Chanda در سال ۱۹۸۹ اشریشیاکلی‌های جداشده از ورم پستان گاوها رانسبت به آمپی‌سیلین و جنتامایسین ۱۰۰ درصد حساس ولی نسبت به پنی‌سیلین، آنها را ۱۰۰ درصد مقاوم معرفی نمود. Nashed و El-yas و ناشد در سال ۱۹۸۸ نشان دادند که اشریشیاکلی و کلبسیلا جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به تورم پستان نسبت به آنتی‌بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین مقاومت دارند (۱۰).

بطور کلی به نظر میرسد، پائین بودن میزان باکتریهای مقاوم در شیر گوسفندان مورد تحقیق میتواند استفاده پائین آنتی‌بیوتیک در این حیوانات باشد. از تعداد ۲ سویه اشریشیاکلی مقاوم هردو سویه قادربه انتقال تمام یا قسمتی از عامل مقاومت خود به سویه آزمایشگاهی *E. coli* - K12 بودند وهمچنین ۱ سویه مقاوم کلبسیلا قادر به انتقال قسمتی از عامل مقاومت خود به سویه آزمایشگاهی *E. coli* - K12 بود.ناظر و توکلی نیز در سال ۱۹۹۴ انتقال فاکتور مقاومت در سویه‌های اشریشیاکلی و کلبسیلا جدا شده از شیر گاوهای مبتلا به تورم پستان راگزارش کردند بطوریکه تمام آنها قادر به انتقال تمام یا قسمتی از فاکتور مقاومت خود به سویه آزمایشگاهی - *E. coli* K12 بودند. ناظر و همکاران همچنین در سال ۱۹۹۱، ۷۲ درصد از سویه‌های مقاوم خانواده آنتروباکتریاسه جدا شده از گوسفندان و بزان مورد آزمایش تمام یا قسمتی از الگوی مقاومت خود گزارش نمودند. Bahl, Mehrotra در بررسی خود نشان دادند که مقاومت داروئی سویه‌های اشریشیاکلی جدا شده از گاوان و پرندگان سالم به سویه حساس سالمونلاتیفی انتقال می یابد (۲).

در این تحقیق همچنین سویه‌های جدا شده ازنظر تولید آنزیم بتالاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند بطوریکه از ۳۷ سویه باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیکهای بتالاکتام، ۲۷ سویه (۷۲/۹۷ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند و ۱۰ سویه (۲۷/۰۳ درصد) قادر به تولید آنزیم نبودند. براساس بررسیهائی که توسط Sheble در سال ۱۹۹۲ برروی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی بیماران در هفت کشور مختلف انجام گرفت، آنزیم بتالاکتاماز توسط ۶۱ و ۷۵ درصد از باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت تولید شده بود که بعد از انجام آزمایش حساسیت برروی این باکتریها، مقاومت نسبت به پنی‌سیلین به ترتیب ۸۶ و ۸۵ درصد، آمپی‌سیلین ۶۷ و ۶۶ درصد و آموکسی‌سیلین ۵۸ و ۵۲ درصد بود (۱۹). ناظر و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که از ۱۳۱ مورد باکتری مقاوم به آمپی‌سیلین جدا شده از گوسفند و بزان، ۱۱۲ مورد (۸۵/۵ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند (۱۶). ناظر و همکاران همچنین در سال ۱۹۹۲ نشان دادند که از ۱۱۰ سویه انتروباکتریا سه مقاوم به آمپی‌سیلین جدا شده از گاو و گوساله، ۹۳ سویه (۸۴/۵۴ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند (۱۷). همچنین در تحقیقی که توسط ناظر و همکاران در سال ۱۹۹۴ نیز انجام گرفت نشان داده شد که از ۱۳۲ سویه باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام جدا شده از شیر گاوان مبتلا به ورم پستان، ۱۰۱ سویه (۷۶ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (۱۵). در مقایسه دو روش اسید و متری و کاپیلری اگر چه اسید و متری ساده‌تر، آسان‌تر و سریعتر است اما روش کاپیلری از دقت و حساسیت بیشتری برخوردار است. در این تحقیق نیز ۸۵/۱ درصد از باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز، با روش کاپیلری نتیجه مثبت را نشان دادند در حالیکه این میزان در روش اسید و متری ۶۲/۱ درصد بود. بنابراین براساس نتایج بدست آمده در این بررسی و نیز شواهد ارائه شده از منابع مختلف می‌توان نتیجه گرفت که تولید آنزیم بتالاکتاماز بعنوان یکی از مکانیسم‌های دفاعی اصلی

جدول ۵: میزان الگوهای مختلف مقاومت در باکتریهای جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به تورم پستان.

نوع باکتری	استافیلوکوک کواگولاز منفی (۸۴ سویه جدا شده)		استرپتوکوک آلفا همولتیک (۴۲ سویه جدا شده)		استافیلوکوکوس آرئوس (۱۵ سویه جدا شده)		باسیلوس سرئوس (۹ سویه جدا شده)		اشریشیاکلی (۵ سویه جدا شده)		سودوموناز آیروجنوزا (۴ سویه جدا شده)		کلبسیلا (۳ سویه جدا شده)		جمع (۱۶۲ سویه جدا شده)	
الگوی مقاومت	مورد مقاوم	درصد مقاوم	مورد مقاوم	درصد مقاوم	مورد مقاوم	درصد مقاوم	مورد مقاوم	درصد مقاوم	مورد مقاوم	درصد مقاوم	مورد مقاوم	درصد مقاوم	مورد مقاوم	درصد مقاوم	مورد مقاوم	درصد مقاوم
یگانه	۸	۹/۵	۳	۷/۱	۲	۱۳/۳	۱	۱۱/۱	۱	۵۰	۰	۰	۰	۰	۱۵	۹/۲
دوگانه	۲	۲/۳	۱	۲/۳	۱	۶/۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۳۳/۳	۵	۳/۰۸
سه‌گانه	۲	۲/۳	۱	۲/۳	۰	۰	۱	۱۱/۱	۰	۰	۲	۵۰	۰	۰	۶	۳/۷
چهارگانه	۱	۱/۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۵۰	۱	۲۵	۰	۰	۳	۱/۸
پنج‌گانه	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱۱/۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰/۶
شش‌گانه	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲۵	۰	۰	۱	۰/۶

میکروارگانیسمها در برابر آنتی‌بیوتیکهای خانواده بتالاکتام بشمار می‌رود.

تشکر و قدردانی

هزینه مربوط به این پروژه توسط شورای محترم تحقیقات دانشگاه شیراز تأمین گردیده است که بدینوسیله قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- American Public Health Association, 1974, Standard method for the examination of dairy products. Thirteen Ed. APHA, New York, 108 pp.

2- Bahl, B.C. and Mehrotra, P.N. 1977, Transfer of drug resistance in *E. coli* strains isolated from poultry, cattle and mutton. Ind. Vet. J.54:503-508.

3- Baron, E.J. and Finegold, S.M., 1990, Bailey and Scott, S. Diagnostic Microbiology. 8th Ed. The C.B. Mosby Company St. Louis, Baltimore. 438 pp.

4- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turk , M., 1966, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Path., 45: 493-496.

5- Bogan, J.A. and Yoxal, A.T., 1983, Pharmacological basis of large animal medicine. 1st Ed. Black Well Scientefic Publication, Oxford, 89 pp.

6- Chanda, A., 1989, Studies on incidence of bovine mastitis, its diagnosis, etiology and in-vitro sensitivity of isolated pathogens. Ind. Vet. J. 66: 271-282.

7- Cowan, S.T. and Steel, K.J., 1974, Manual for identification of medical bacteria. Cambridge University Press, London.

8- Darrell, M. and Waterworth, J., 1967, Antibiotic resistance in veterinary practice. J. Clinical Path. 21:202.

9- Edwards, R. and Ewing, W.H., 1972, Indentification of entero-bacteriaceae, Third Ed., Burgess Publication Co., U.S.A.

10- El-yas, A.H. and Nashed, S.M. 1988, Bacteriological studies on mastitis in ewes and she-goats. Vet. Bull. 60(1-71). Abst.11.

11- Fthenakis, G.C. and Jones, J.E.T., 1990, The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci in to the ovine mammary gland. J. Comp. Path. 102: 211-219.

12. Jones, J.E.T., 1991, Mastitis in sheep. Vet. Bull. 61(8). Abst. 798.

13- Lowbury, E.J.L., 1972, Drug resistance in antimicrobiol therapy. Chales. C. Thomas. Publisher. 106 pp.

14- Nazer, A.H.K. 1980, Transmissible drug resistance in *E. coli* isolated from poultry and their carcasses in Iran. Cornell Vet. 70: 365-371.

15- Nazer, A.H.K., Tavakoli, A.R., 1994, Prevalance of antibiotic resistance and beta-lactamase production by bacteria isolated from cases of bovine mastitis. J. Appl. Anim. Res. 6:167-176.

16- Nazer, A.H.K., Dadras, H. and Ahmad Panahi, S.J. 1995, Antibiotic resistance patterns, transmission of R-factor and determination of beta-lactamase production in ampicillin resistant strains of enterobacteriaceae isolated from sheep and goats. J. Fac. of Vet. Med. Univ. of Tehran, 49:17-29.

17- Nazer, A.H.K. Dadras, H. and Shadkhast, M., 1995, Beta lactamase production in ampicillin - resistant strains of enterobacteriaceae isolated from cattle. Ind. J. Anim. Sci. 65: 302-304.

18- Rosen, I.G., Jacobson, J., and Rudderman, F., 1972, Rapid capillary tube method for detecting penicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Appl. Mic. 23: 649-650.

19- Shible, A.M. 1992, Incidence of beta -lactamase production among out-patient clinical isolated in middle eastern countries and their antibiotic susceptibility. Chemotherapy. 3: 324-329.

20- Sng. E.H., Yeo, K.L. and Rajan, V.S., 1981, Simple method for detecting penicillinase- producing *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphlococcus aureus*. British J. Veneral Dis. 55: 723-729.

21- Watkins, G.H., Burriel, A.R., and Jones, J.E.T., 1991, A field investigation of subclinical mastitis in sheep in southern England. Br. Vet. J. 147: 413-420.

جدول ۶: میزان تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای خانواده بتالاکتام جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان.

نوع باکتری	مقاومت بتالاکتامی	بتالاکتاماز (+)		بتالاکتاماز (-)		روش کاپیلری (+)		روش اسیدومتری (+)	
		موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد
استافیلوکوک کواگولاز منفی	۱۱	۸	۷۲/۷	۳	۲۷/۳	۷	۸۷/۵	۶	۷۵
استرپتوکوک آلفا هولتیک	۵	۴	۸۰	۱	۲۰	۴	۱۰۰	۳	۷۵
استافیلوکوکوس آرئوس	۲	۱	۵۰	۱	۵۰	۱	۱۰۰	۱	۱۰۰
سودو موناز آیروجنوزا	۸	۶	۷۵	۲	۲۵	۴	۴۴/۴	۲	۲۲/۲
باسیلوس سرئوس	۶	۵	۸۳/۳	۱	۱۶/۷	۴	۶۶/۶	۳	۲۲/۲
اشریشیاکلی	۳	۲	۶۶/۶	۱	۳۳/۴	۲	۱۰۰	۱	۵۰
کلبسیلا	۲	۱	۵۰	۱	۵۰	۱	۱۰۰	۱	۱۰۰
جمع	۳۷	۲۷	۷۲/۹۷	۱۰	۲۷/۰۳	۲۳	۸۵/۱۸	۱۷	۶۲/۹۶