بررسی تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتریهای جداشده از شیر بزان مبتلا به ورم پستان

دکتر عبداله‌حسین خان‌ناظر[1] دکتر محسن جعفری[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۳، ۱۱-۷، (۱۳۷۹)

در این بررسی میزان شیوع بیماری تورم پستان، الگوهای مختلف مقاومتهای آنتی‌بیوتیکی و نیز تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و سفالکسین در باکتریهای مولد تورم پستان در بزهای شیری انجام گرفت. در انجام این تحقیق تعداد ۲۰۵ رأس بز شیری که بیش از دو هفته از زایمان آنها گذشته بود از بین ۹ گله مختلف اطراف شیراز انتخاب شدند و تعداد ۴۱۰ نمونه شیر تهیه شده به آزمایشگاه آورده شد. میزان شیوع تورم پستان بالینی و تحت‌بالینی به‌ترتیب ۲/۴ و ۲۶/۸ درصد بود. از ۹۸ نمونه شیر بزهای مبتلا به تورم پستان (CMT مثبت) ۵۵ باکتری جدا گردید. این موارد شامل ۴۱/۸ درصد استافیلوکوک کوآگولاز مثبت، ۲۹ درصد استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی، ۷/۳ درصد باسیلوس سرئوس، ۷/۳ درصد اشریشیاکلی، ۳/۶ درصد استرپتوکوک آلفاهمولیتیک، ۳/۶ درصد میکروکوک، ۱/۸ درصد نیسریا مننگوکوک، ۱/۸ درصد انتروباکتر، ۱/۸ درصد سودوموناس مولتی‌فیلیا و ۱/۸ درصد پروتئوس بود. در آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتریهای جداشده بین صفر درصد (استرپتوکوک آلفاهمولیتیک، میکروکوک، نیسریا مننگوکوک و پروتئوس) و ۱۰۰ درصد (اشریشیاکلی، سودوموناس مولتی‌فیلیا و انتروباکتر) به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند. از دو روش کاپیلری و اسیدومتری برای آزمایش باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز استفاده شد که روش کاپیلری و اسیدومتری به‌ترتیب قادر به تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در ۹۳/۱ و ۶۵/۵ درصد از موارد بودند.

واژه‌های کلیدی : ورم پستان، بز، بتالاکتاماز.

جمعیت جهان روزبه‌روز زیادتر می‌شود و تأمین غذای این جمعیت رو به تزاید یکی از مسایلی است که محققان را وادار کرده تا به فکر راههای بهتری برای تأمین غذا باشند. یکی از منابع مهم غذایی، پروتئینها هستند. قسمت اعظم پروتوپلاسم سلولی را پروتئین تشکیل می‌دهد و از اینجا نقش حیاتی پروتئین از نظر شرکت در ساختمان بدن روشن می‌شود. به‌علاوه پروتئین در ترمیم نسوج آسیب‌دیده بدن و در کنترل و تنظیم اعمال حیاتی بدن (به‌صورت آنزیمها و هورمونها) نقش بسیار مهمی دارد (۱۰).

پروتئینها از دو منبع تهیه می‌شوند : گیاهان و جانوران، غذاهایی که به‌طور روزانه پروتئین مورد نیاز انسان را تأمین می‌کنند، عبارت‌اند از : گوشت، شیر و تخم‌مرغ. یکی از حیواناتی که در تأمین شیر و گوشت نقش دارد، بز است و یکی از بیماریهایی که باعث کاهش منابع پروتئینی می‌شود تورم پستان است. پس مبارزه با تورم پستان بز یکی از راههای مبارزه با کاهش منابع پروتئینی است.

صرف‌نظر از عامل بیماری میزان اشاعه ورم پستان در گاو در اکثر کشورها ارقام مشابهی در حدود ۴۰ درصد را نشان می‌دهد و اگر میزان آلودگی را برحسب یکی از سرپستانها در نظر بگیرند این رقم به ۲۵ درصد می‌رسد. این رقم در بز و گاومیش که به‌منظور تهیه شیر نگهداری می‌شوند نیز همین مقدار است (۷).

در صورت وجود تورم پستان در بزها، اغلب حذف آلوده‌ها یک روش اقتصادی می‌باشد (۲۱). با توجه به مطالب بالا فراهم‌آوردن روشهای اقتصادی برای تشخیص و درمان مبتلایان و بازگرداندن آنها به چرخه تولید از مسایلی است که باید مورد توجه قرار گیرد. یکی از راههای مؤثر برای کنترل تورم پستان استفاده از آنتی‌بیوتیکها است. گوناگونی آنتی‌بیوتیکهایی که قادرند به‌صورت داخل پستانی و یا درمان عمومی در درمان تورم پستان مورد استفاده قرار گیرند در کشورهای مختلف متفاوت است.

متأسفانه استفاده وسیع بخصوص در مواردی که به‌طور نامناسب، مصرف می‌شود منجر به افزایش سویه‌های مقاوم باکتری در برابر آنتی‌بیوتیکها شده است. پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و مونوباکتام‌ها جزء بتالاکتام‌ها هستند که با سه مکانیسم موجب جلوگیری از رشد میکروبها می‌شوند. اتصال دارو به PBP (Penicillin-Binding-Protein) که به‌عنوان گیرنده دارو روی باکتری عمل می‌کند، مهارکردن سنتز دیواره سلولی به‌وسیله بلوک‌کردن عمل ترانس پپتیداسیون در پپتیدوگلایکان و فعال‌کردن آنزیمهای اتولیزکننده در دیواره سلولی که می‌تواند ضایعاتی در دیواره سلولی ایجاد و مرگ باکتری را سبب شود (۶). مجموع پنی‌سیلیناز و سفالوسپوریناز تحت‌عنوان بتالاکتاماز خوانده می‌شود. بیش از ۵۰ آنزیم بتالاکتاماز از لحاظ شیمیایی شناسایی شده که توسط میکرواورگانیسمها تولید می‌گردند تعداد زیادی از بتالاکتامازهای شناخته شده تحت کنترل پلاسمید می‌باشند (۱۳).

مهمترین نوع مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام، غیرفعال‌شدن این داروهاست که عمدتاً توسط آنزیمهای بتالاکتاماز انجام می‌شود. این آنزیمها حلقه بتالاکتام آنتی‌بیوتیکهای پنی‌سیلین و سفالوسپورین‌ها را می‌شکافند و پنی‌سیلوئیک اسید تولید می‌کنند که مشتقی غیرفعال است. این آنزیم هم در باکتریهای گرم مثبت و هم در باکتریهای گرم منفی وجود دارد ولی از نظر ساختمانی در باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی با هم فرق دارند (۱۴). بنابراین تعیین میزان مقاومت ایجادشده ناشی از تولید این آنزیم در باکتریهای مولد تورم پستان گام مؤثری در جهت ارایه الگوی مناسبتری جهت استفاده از آنتی‌بیوتیکهای مختلف برای درمان و کنترل این بیماری خواهد بود. اهداف این تحقیق عبارت‌اند از :

۱. تعیین درصد بزهای مبتلا به ورم پستان به روش C.M.T (California Mastitis Test) در دامداریهای اطراف شیراز.

۲. بررسی میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مجموع باکتریهای جداشده.

۳. تعیین و تشخیص آنزیم بتالاکتاماز در سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین و سفالکسین.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری : بعد از اینکه پستان بزان شسته و خشک می‌شد به‌وسیله پنبه آغشته به الکل، سرپستانک به‌طور کامل ضدعفونی‌شده و ابتدا چند دوشش اولیه را دور ریخته و سپس مقدار ۱۰ سی‌سی شیر در شیشه دربدار استریل جمع‌آوری و در کنار یخ نمونه‌ها به دانشکده حمل می‌شد. روش C.M.T برروی هر نمونه شیر براساس توصیه دستورالعمل (American Public Health Association 1974) انجام می‌گرفت (۳).

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

نمونه‌هایی که براساس آزمایش C.M.T مثبت تشخیص داده می‌شدند مورد

۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.
۲) دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

آزمایش باکتریولوژی قرار می‌گرفتند. جداسازی و تشخیص گونه‌های مختلف باکتریها برطبق روشهای Cowan & Steel (1974)، Edwards & Ewing (1972) و Baron & Finegold (1990) انجام پذیرفت (۱۲، ۱۱، ۴).

آزمایش آنتی‌بیوگرام : جهت آزمایش حساسیت ابتدا گونه‌های باکتریهای مختلف‌جداشده‌رادرمحیط‌آبگوشت (Tryptone Soya Broth Oxoid CM 129) T.S.B کشت داده و پس از ۶ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد برروی محیط آگار D.S.T (Diagnostic Sensitivity Test Agar Oxoid CM 261) گسترده و سپس برروی هر محیط از دیسکهای آنتی‌بیوتیکی ذیل قرار داده می‌شد:
Penicillin (P. 10i.u), Ampicillin (Am. 25ug), Amoxicillin (Amx. 25 ug) Tetracycline (Te. 50 ug), Streptomycin (St. 25 ug), Cephalexin (Ce. 30 ug), Gentamycin (G. 10 ug), Chloramphenicol (Chl. 50 ug)

روش تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز : آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام به دو روش کاپیلری (Rosen و همکاران، ۱۹۷۲) و اسیدومتری (Sng و همکاران، ۱۹۸۰) انجام پذیرفت (۱۹ و ۲۲). وقتی بتالاکتاماز، بنزیل پنی‌سیلین را هیدرولیز می‌کند، پنی‌سیلوئیک اسید (Penicilloic acid) تولید می‌شود که می‌توان با استفاده از یک رنگ مشخص‌کننده و با اندازه‌گیری تغییرات pH و یا با اندازه‌گیری مقدار ید تولیدشده و همچنین تغییر رنگ آبی به‌وجود آمده در اثر ترکیب با نشاسته، وجود آنزیم را تأیید نمود. روش دیگر این است که وقتی آنزیم حلقه بتالاکتام یک سفالوسپورین رنگزا مانند نیتروسفین (Nitrocefin) را هیدرولیز می‌کند، وجود آن را برحسب تغییر رنگ از زرد به قرمز تأیید نمود.

آزمایش تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز، برروی گونه‌های مقاوم نسبت به آمپی‌سیلین و به دو روش بالا صورت گرفت.

نتایج

در این تحقیق مجموعاً تعداد ۲۰۵ رأس بز شیری که بیش از دو هفته از زایمان آنها گذشته بود به روش C.M.T آزمایش شدند. از تعداد کل ۲۰۵ رأس بز شیری ۵۵ رأس (۲۶/۸ درصد) مبتلا به فرم تحت‌بالینی تورم پستان و ۵ رأس (۲/۴ درصد) مبتلا به فرم بالینی تورم پستان و ۱۴۵ رأس (۷۰/۷ درصد) غیرمبتلا بودند (جدول ۱). در این بررسی شیر پستانهایی که از نظر C.M.T مثبت بودند از نظر باکتریولوژی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که نمونه‌هایی که از نظر C.M.T سالم تشخیص داده شده بودند نیز آزمایش شدند که از نمونه‌های ۱۴۵ رأس بز سالم، نمونه‌های پستان ۳ بز دارای باکتری بود که از یکی، دو باکتری باسیلوس سرئوس و استافیلوکوک کوآگولاز منفی، از دومی استافیلوکوک کوآگولاز مثبت و از سومی استافیلوکوک کوآگولاز منفی جدا شد.

جدول ۱ – میزان شیوع تورم پستان بالینی و تحت‌بالینی در بزها

گله	محل دامداری	تورم پستان تحت‌بالینی: بزها، آزمایش‌شده	بزها، CMT(+)	پستانها، آزمایش‌شده	پستانها، CMT(+)	تعداد بزهای مبتلا به تورم پستان بالینی
۱	ترک‌آباد	۲۳	۷	۴۶	۱۳	
۲	ترک‌آباد	۴۳	۱۴	۸۶	۲۱	
۳	باجگاه	۵	-	۱۰	-	
۴	تخت جمشید	۱۶	۲	۳۲	۲	
۵	درمانگاه دانشکده	۱۵	۸	۳۰	۹	۳
۶	تخت جمشید	۱۲	۲	۲۴	۳	
۷	دودج	۳۱	۵	۶۲	۱۰	
۸	دودج	۳۷	۷	۷۴	۱۴	۲
۹	لپویی	۲۳	۱۰	۴۶	۲۰	
	جمع	۲۰۵	۵۵(٪۲۶/۸)	۴۱۰	۹۲(٪۲۲)	۵(٪۲/۴)

جدول ۲ – مقاومت دارویی باکتریهای عامل تورم پستان جداشده از نمونه‌های شیر

نوع باکتری	تورم پستان تحت بالینی: موارد جداشده	تورم پستان تحت بالینی: مقاومت	تورم پستان بالینی: موارد جداشده	تورم پستان بالینی: مقاومت
استافیلوکوک کوآگولاز مثبت	۲۰	۱۷(٪۸۵)	۳	۳(٪۱۰۰)
استافیلوکوک کوآگولاز منفی	۱۶	۶(٪۳۷/۵)		
اشریشیاکلی	-	-	۴	۴(٪۱۰۰)
نیسریا مننگوکوک	۱	-(٪)		
انتروباکتر	۱	۱(٪۱۰۰)		
پروتئوس	۱	-(٪۰)		
سودوموناس مولتی‌فیلیا	۱	۱(٪۱۰۰)		
باسیلوس سرئوس	۴	۱(٪۲۵)		
استرپتوکوکوس آلفاهمولیتیک	۲	-(٪۰)		
میکروکوک	۲	-(٪۰)		
جمع	۴۸	۲۶(٪۵۴/۱)	۷	۷(٪۱۰۰)

براساس نتایج به‌دست آمده از کشت باکتریولوژیکی نمونه‌های C.M.T مثبت، از تعداد ۵۵ باکتری جداشده تعداد ۲۳ سویه (۴۱/۸ درصد) استافیلوکوکهای کوآگولاز مثبت، ۱۶ سویه (۲۹ درصد) استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی، ۴ سویه (۷/۳ درصد) باسیلوس سرئوس، ۲ سویه (۳/۶ درصد) استرپتوکوک آلفا همولیتیک، ۲ سویه (۳/۶ درصد) میکروکوک، ۴ سویه (۷/۳ درصد) اشریشیاکلی، ۱ سویه (۱/۸ درصد) سودوموناس مولتی‌فیلیا شناسایی گردید (جدول ۲). نتایج حاصل از آزمایش حساسیت نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک در باکتریهای جداشده از شیر بزهای مبتلا به ورم پستان در جدول ۳ مشاهده می‌شود (جدول ۳).

در این بررسی ۱۹ نوع الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف به‌دست آمد (جدول ۴). باکتریهای با الگوی مقاومت سه گانه بیشترین تعداد را به خود اختصاص داده بودند. در مجموع از ۳۳ مورد باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام ۲۹ مورد (۸۷/۸۸ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند که ۲۷ مورد (۹۳/۱ درصد) به روش کاپیلری و ۱۹ مورد (۶۵/۵ درصد) به روش اسیدومتری جواب مثبت دادند (جدول ۵).

بحث

با توجه به نتایج به‌دست آمده شیوع تورم پستان در بزهای اطراف شیراز در مقایسه با گوسفندهای اطراف شیراز بیشتر و از گاوهای اطراف شیراز کمتر است (۱۸ و ۱). علل پایین‌بودن تورم پستان بزها در این منطقه را می‌توان به عواملی مثل صنعتی‌نبودن پرورش بز در منطقه و متراکم‌نبودن آنها در یک منطقه و عدم استفاده دامداران از ماشینهای شیردوشی نسبت داد.

در این بررسی از تعداد ۹۸ نمونه شیر بزهای مبتلا به تورم پستان (C.M.T مثبت) ۵۵ باکتری مختلف جدا شد که شامل ۲۳ سویه (۴۱/۸ درصد) استافیلوکوک کوآگولاز مثبت، ۱۶ سویه (۲۹ درصد) استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی، ۴ سویه (۷/۳ درصد) باسیلوس سرئوس، ۲ سویه (۳/۶ درصد) استرپتوکوک آلفاهمولیتیک، ۲ سویه (۳/۶ درصد) میکروکوک، ۴ سویه (۷/۳ درصد) اشریشیاکلی، ۱ سویه (۱/۸ درصد) نیسریا مننگوکوک، ۱ سویه (۱/۸ درصد) انتروباکتر، ۱ سویه (۱/۸ درصد) پروتئوس و ۱ سویه (۱/۸ درصد) سودوموناس مولتی‌فیلیا بود (جدول ۲).

میشرا (Mishra) و همکاران در سال ۱۹۹۶ در هند نشان دادند که ۳۴/۱ درصد از باکتریهای جداشده از تورم پستان، استافیلوکوک بودند که ۲۲/۷ درصد کوآگولاز مثبت و ۱۱/۳۶ درصد کوآگولاز منفی بودند (۱۶). در یک بررسی در سال ۱۹۹۵، لیما جونیور و همکاران درصد استافیلوکوکهای جداشده را ۸۲/۴۷ درصد از باکتریهای جداشده از بزها ذکر کردند (۱۵). آنها متذکر شدند در

جدول ۳ - نتایج حاصل از آزمایش حساسیت نسبت به ۸ آنتی‌بیوتیک در باکتریهای جداشده از شیر بزهای مبتلا به تورم پستان

نوع باکتری		نوع آنتی‌بیوتیک							
		تتراسیکلین	آمپی‌سیلین	آموکسی‌سیلین	پنی‌سیلین	جنتامایسین	استرپتومایسین	کلرامفنیکل	سفالکسین
استافیلوکوک کوآگولاز منفی (۱۶ سویه)	مورد مقاوم	۴	۷	۵	۶	۰	۶	۲	۴
	درصد مقاوم	۲۵	۴۳/۷	۳۱/۲	۳۷/۵	۰	۳۷/۵	۱۲/۵	۲۵
استافیلوکوک کوآگولاز مثبت (۲۳ سویه)	مورد مقاوم	۲	۱۶	۱۸	۱۸	۰	۲	۲	۲
	درصد مقاوم	۸/۶	۶۹/۵	۷۵	۷۵	۰	۸/۶	۸/۶	۸/۶
استرپتوکوک آلفاهمولیتیک (۲ مورد جداشده)	مورد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	درصد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
باسیلوس سرئوس ۴ سویه (۴ سویه جداشده)	مورد مقاوم	۰	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۰
	درصد مقاوم	۰	۲۵	۲۵	۲۵	۰	۲۵	۰	۰
اشریشیاکلی ۲ سویه (۲ سویه جداشده)	مورد مقاوم	۲	۲	۲	۴	۰	۰	۳	۱
	درصد مقاوم	۵۰	۷۵	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۷۵	۲۵
سودوموناس مولتی‌فیلیا (۱ سویه جداشده)	مورد مقاوم	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱
	درصد مقاوم	۰	۰	۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۱۰۰
پروتئوس (۱ سویه جداشده)	مورد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	درصد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
انتروباکتر (۱ سویه جداشده)	مورد مقاوم	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰
	درصد مقاوم	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۰	۰	۰	۰
میکروکوک (۲ سویه جداشده)	مورد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	درصد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نیسریا مننگوکوک (۱ سویه جداشده)	مورد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	درصد مقاوم	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع سویه جداشده (۵۵)	مورد مقاوم	۸	۲۷	۲۹	۳۱	۰	۹	۷	۸
	درصد مقاوم	۱۴/۵	۴۹	۵۲/۷	۵۶/۳	۰	۱۶/۳	۱۲/۷	۱۴/۵

مناطقی که تورم پستان مایکوپلاسمایی وجود ندارد، عمده‌ترین علت تورم پستان استافیلوکوک کوآگولاز مثبت می‌باشد. ولی معمولترین باکتری که از شیر جدا می‌شود استافیلوکوک کوآگولاز منفی می‌باشد.

در این تحقیق میزان استافیلوکوکها ۳۹ مورد (۷۰/۸ درصد) بود که از نظر غالب‌بودن استافیلوکوکها با تحقیقات فوق مطابقت دارد. همچنین در این تحقیق میزان استافیلوکوک کوآگولاز مثبت بیشتر از استافیلوکوک کوآگولاز منفی بود که با تحقیقات فوق به جز تحقیق میشرا مغایرت دارد. در این بررسی از تعداد ۲۳ سویه استافیلوکوک کوآگولاز مثبت جداشده، ۲۰ سویه (۸۶/۹ درصد) نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند که بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی‌سیلین و پنی‌سیلین هر کدام (۷۵ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به تتراسیکلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل و سفالکسین هر کدام (۸/۶ درصد) بود. در مورد استافیلوکوکهای کوآگولاز منفی نیز از ۱۶ سویه جداشده ۶ سویه نسبت به چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند که بیشترین مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین (۴۳/۷ درصد) و کمترین مقاومت نسبت به کلرامفنیکل (۱۲/۵ درصد) بود. همچنین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین (۳۷/۵ درصد) به‌دست آمد (جدول ۳). علت مقاومت بالای سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس نسبت به پنی‌سیلین را می‌توان استفاده وسیع از آن در درمان تورم 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 به‌دست آمده در این تحقیق ۸۹/۵ درصد از سویه‌های استافیلوکوک کوآگولاز مثبت و ۷۱/۴ درصد از سویه‌های استافیلوکوکهای کواگولاز منفی قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند که قاعدتاً میزان مقاومت بالاتر از این باکتریها بخصوص استافیلوکوک کواگولاز مثبت به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام را توجیه می‌کند. سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس همچنین نسبت به آنتی‌بیوتیکهای استرپتومایسین و تتراسیکلین دارای درجات مختلفی از مقاومت بودند که در مورد استرپتومایسین، به‌خاطر استفاده توأم استرپتومایسین و پنی‌سیلین در درمان بیماریها و در مورد تتراسیکلین به‌خاطر استفاده درمانی این آنتی‌بیوتیک در بیماریها می‌باشد.

در مورد حساس‌بودن تمام سویه‌های استافیلوکوک به جنتامایسین می‌توان دلیل آن را استفاده ناچیز از این آنتی‌بیوتیک در حیوانات، قدرت بالای آنتی‌بیوتیکی آن و اینکه مقاومت به جنتامایسین به‌واسطه جهش و به آهستگی و در طی چند مرحله بروز می‌کند دانست.

مقاومت بالای استافیلوکوکها نسبت به آمپی‌سیلین و آموکسی سیلین با توجه به اینکه مصرف این آنتی‌بیوتیکها در حیوانات در حد پایینی است، دلیل بر گسترش بالای باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز در طبیعت است همین احتمال انتقال سویه‌های مقاوم از حیوانات مختلف و بخصوص گاو به بز وجود دارد.

از ۴ سویه باسیلوس سرئوس جداشده یک سویه (۲۵ درصد) که نسبت به آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، پنی‌سیلین و استرپتومایسین مقاوم بود. با توجه به اینکه این باکتری قادر به زنده‌ماندن در پمادهای پستانی حاوی آنتی‌بیوتیک می‌باشد، بنابراین باید درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی را برای آن انتظار داشت. ناظر و زاهدی در سال ۱۳۷۵ مقاومت باسیلوس سرئوس جداشده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان را نسبت به پنی‌سیلین و سفالکسین هر کدام ۲۲/۲ درصد و نسبت به آمپی‌سیلین، آموکسی سیلین و استرپتومایسین هر کدام ۱۱/۱ درصد گزارش کردند (۱).

از ۴ سویه اشریشیاکلی جداشده، هر ۴ سویه (۱۰۰ درصد) نسبت به چند آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند که بیشترین مقاومت نسبت به آموکسی سیلین و

جدول ۴ – انواع الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریهای جداشده از شیر بزان مبتلا به ورم پستان

یگانه، مضاعف و سه‌گانه	چهارگانه، پنجگانه، ششگانه و هفتگانه
P. Amp. Amx	P. Amp. Amx. Ce. S. T. Ch.
P. Amx. Ch.	P. Amp. Amx. Ce. S. T.
P. Amx. Ce.	P. Amp. Amx. Ce. S. Ch.
Amp. Ce. S.	P. Amp. Amx. S. T.
	P. Amp. Amx. S. T.
P. Amp.	P. Amp. Amx. T. Ch.
P. Amx.	P. Amp. Amx. Ce.
P.	P. Amx. S. T.
Amp.	P. Amp. Amx. Ch.
Ce.	P. Amp. Amx. S.

جدول ۵ – میزان تولید بتالاکتاماز در باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای خانواده بتالاکتام جداشده از شیر بزهای مبتلا به تورم پستان

نوع باکتری	مقاومت بتالاکتامی	بتالاکتاماز (+)		بتالاکتاماز (-)		روش کاپیلری		روش اسیدومتری	
		موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد	موارد	درصد
استافیلوکوک کوآگولاز منفی	۷	۵	۷۱/۴	۲	۱۴/۳	۵	۱۰۰	۲	۶۶/۶
استافیلوکوک کوآگولاز مثبت	۱۹	۱۷	۸۹/۵	۲	۰	۱۵	۸۸/۲	۱۵	۸۸/۲
سودوموناس مولتی‌فیلیا	۱	۱	۱۰۰	۰	۰	۱	۱۰۰	۰	۰
باسیلوس سرئوس	۱	۱	۱۰۰	۰	۰	۱	۱۰۰	۰	۰
اشریشیاکلی	۴	۴	۱۰۰	۰	۰	۴	۱۰۰	۱	۲۵
انتروباکتر	۱	۱	۱۰۰	۰	۰	۱	۱۰۰	۰	۰
جمع	۲۲	۲۹	۸۷/۸۸	۴	۱۲/۱۲	۲۷	۹۳/۱	۱۹	۶۵/۵

پنی‌سیلین هر کدام با ۱۰۰ درصد و کمترین مقاومت نسبت به سفالکسین با ۲۵ درصد بود. همچنین نسبت به جنتامایسین و استرپتومایسین همه حساس بودند. ناظر و زاهدی در سال ۱۳۷۵ مقاومت اشریشیاکلی جداشده از شیر گوسفندان مبتلا به تورم پستان را در برابر پنی‌سیلین ۴۰ درصد گزارش کردند. همچنین مقاومت اشریشیاکلی جداشده از شیر گاوهای مبتلا به تورم پستان در برابر پنی‌سیلین ۱۰۰ درصد گزارش بود (۱).

چاندا در سال ۱۹۸۹ اشریشیاکلی‌های جداشده از تورم پستان گاوها را نسبت به آمپی‌سیلین و جنتامایسین ۱۰۰ درصد حساس ولی نسبت به پنی‌سیلین، آنها را ۱۰۰ درصد مقاوم معرفی نمود (۹).

سایر باکتریهای جداشده در این تحقیق که شامل ۲ سویه استرپتوکوک آلفا همولیتیک و ۱ سویه نیسریا مننگوکوک و ۱ سویه پروتئوس و ۲ سویه میکروکوک بود هیچ گونه مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان ندادند. ناظر و زاهدی در سال ۱۳۷۵ مقاومت استرپتوکوک نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک را ۱۱/۹ درصد گزارش کردند که بیشترین مقاومت نسبت به پنی‌سیلین با ۷/۱ درصد و کمترین مقاومت نسبت به سه آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و استرپتومایسین هر کدام با ۲/۳ درصد بود (۱).

در این تحقیق همچنین سویه‌های جداشده از نظر تولید آنزیم بتالاکتاماز مورد بررسی قرار گرفتند، به‌طوری که از ۳۳ سویه باکتریهای مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای بتالاکتام ۲۹ سویه (۸۷/۸۸ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند و ۴ سویه (۱۲/۱۲ درصد) قادر به تولید این آنزیم نبودند (جدول ۵).

ناظر و همکاران در سال ۱۳۷۳ نشان دادند که از ۱۳۱ مورد باکتری مقاوم به آمپی‌سیلین جداشده از گوسفندان ۱۱۲ مورد (۸۵/۵ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۲). این محققین همچنین نشان دادند که از ۱۱۰ سویه انتروباکتریاسه مقاوم به آمپی‌سیلین جداشده از گاو و گوساله، ۹۳ سویه (۸۴/۵۴ درصد) قادر به تولید آنزیم بتالاکتاماز بودند که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت دارد (۱۸).

ساندرز در سال ۱۹۹۲ افزایش بتالاکتامازهای القاءپذیر را به‌عنوان عامل مقاومتهای چندگانه نسبت به آنتی‌بیوتیکهای خانواده بتالاکتام در باکتریهای انتروباکتریاسه و سودوموناس می‌داند (۲۰).

در مقایسه دو روش اسیدومتری و کاپیلری، مشخص شد که اگرچه اسیدومتری ساده‌تر، آسانتر و سریعتر است، اما روش کاپیلری از دقت و حساسیت بیشتری برخوردار است. در این تحقیق ۹۳/۱ درصد از باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز، با روش کاپیلری نتیجه مثبت را نشان دادند، در حالی که این میزان در روش اسیدومتری ۶۵/۵ درصد بود.

ناظر و همکاران در سال ۱۳۷۵ نشان دادند که ۸۵/۱ درصد از باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز جداشده از گوسفندان با روش کاپیلری نتیجه مثبت نشان داده‌اند در حالی‌که این میزان در روش اسیدومتری ۶۲/۹ درصد بود (۱).

در تحقیقی دیگر در سال ۱۳۷۳، ناظر و همکاران نشان دادند که ۹۲/۸۶ درصد از باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز جداشده از گوسفندان و بزها با روش کاپیلری بودند در حالی‌که این میزان در روش اسیدومتری ۶۶/۰۷ درصد بود (۲). همچنین ناظر و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان دادند که ۸۴/۱۵ درصد از باکتریهای مولد آنزیم بتالاکتاماز جداشده از شیر گاوهای مبتلا به تورم پستان با روش کاپیلری و ۶۲/۷۳ درصد به روش اسیدومتری مثبت می‌باشند (۱۸).

بنابراین، براساس نتایج به‌دست آمده در این بررسی و همچنین شواهد ارایه‌شده از منابع مختلف می‌توان نتیجه گرفت که تولید آنزیم بتالاکتاماز یکی از مکانیسمهای دفاعی اصلی میکروارگانیسمها در برابر آنتی‌بیوتیکهای خانواده بتالاکتام به‌شمار می‌رود. هر چند که امروزه با توجه به پیشرفتهایی که در تولید آنتی‌بیوتیکهای تازه و نیز مهارکننده‌های آنزیم بتالاکتاماز و یا آنتی‌بیوتیکهایی که نسبت به بتالاکتاماز مقاوم باشند، صورت گرفته است ولی طی تحقیقی که توسط ساندرز انجام گرفته، مشخص شده است که بتالاکتام‌های جدید در مصارف درمانگاهی باعث ایجاد مکانیسم دیگری از مقاومت در باکتریهای گرم منفی می‌شوند که این در اثر تولید آنزیمهای جدیدی می‌باشد که در حقیقت مشتقات همان بتالاکتامازها می‌باشند (۲۰).

منابع

۱. خان‌ناظر، ع.ح. و زاهدی ا. بررسی تولید بتالاکتاماز در باکتریهای جداشده از گوسفندان مبتلا به ورم پستان با دو روش کاپیلری و اسیدومتری، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۳۰، صفحه : ۱۲۰-۱۱۶، (۱۳۷۵).

۲. خان‌ناظر، ع.ح.، دادرس، ح. و احمدپناهی، ج. بررسی مقاومتهای قابل انتقال در باکتریهای خانواده انتروباکتریاسه و تشخیص تولید آنزیم بتالاکتاماز در گونه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین در گوسفند و بز. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۴۹، شماره ۱ و ۲، صفحه : ۳۰-۲۰، (۱۳۷۳).

3. American Public Health Association. Standard method for the examination of dairy products. Thirteen Ed. APHA, New York, pp: 108, (1974).

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

5. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turk, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, Amer. J. Clin. Path, 45: 493-496, (1966).
6. Betina, V. The Chemistry and Biology of Antibiotics. Amesterdam. Elviser Scientific Publishing Co., pp: 98-112, (1983).
7. Blood, D.C. and Radostitis, O.M. Veterinary Medicine. 7th ed. London, Bailliertindall. pp: 501-553, (1989).
8. Brain, M. and Barker, F. Antimicvokial agents in medicine. First Ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp: 9-26, (1973).
9. Chanda, A., Roy, C.R., Banerjee, P.K. and Gaha, C. Studies on incidence of bovine mastitis, it's diagnosis, etiology and invitro sensitivity of the isolated pathogens. Ind. Vet. J. 66: 277-282, (1989).
10. Church, D.C. and Pound, W.G. Basic animal nutrition and feeding. Third Ed., Wiley and Son, Inc. New York, pp: 77, (1988).
11. Cowan, S.T. and Steel, K.J. Manual for identification of medical bacteria. Cambridge University Press, London, pp: 206, (1974).
12. Edwards, R. and Ewing, W.H. Identification of enterobacteriaceae, third Ed., Burgess publication Co., U.S.A. pp: 362, (1972).
13. Jawetz, E., Melnmick, J.L. and Adelberg, E.A. Review of Medical Microbiology, 7th ed. Applentun and Lange. California, pp: 130-136, (1987).
14. Katzung, B.G. Basic and Clinical Pharmacology. 5th Ed. California: Appleton and Lange, pp: 724-736, (1995).
15. Lima Junior, A.D. and Vianni, M.C.E. Correlation among the california mastitis test, somotic cell count, and bacteriological examination of goat milk. Br. Vet. J. 147: 422-430, (1996).
16. Mishra, P.R. and Shidhartha, H. Subclinical mastitis in goat with special reference to fungus. Ind. J. Dairy Sci., 49(3): 209-210, (1996).
17. Nazer, A.H.K., Dadras, H. and Shadkhast, M. Beta-lactamase production in ampicillin resistance strain of enterobacteriaceae isolated from cattle. Ind. J. Anim. Sci., 65(3): 302-304, (1995).
18. Nazer, A.H.K. and Tavakolli, A.R. Prevalance of antibiotic resistance and beta-lactamase production by bacteria isolated from cases of bovine mastitis. J. Appl. Anim. Res. 6: 167-176, (1994).
19. Rosen, I.G., Jacobson, J. and Rudderman, F. Rapid capillary tube method for detecting penicillin resistance in Staphylococcus aureus. Appl. Mic. 23: 649-650, (1972).
20. Sanders, C.C. and Sanders, W.E. Beta-lactam resistance in gram negative bacteria. Clin. Infect. Dis. 15: 824-839, (1992).
21. Smith, M.C. and Sherman, D.M. Goat Medicine. Philadelphia. Lea and Febiger, pp: 459-465, (1994).
22. Sng, E.H., Yeo, K.L. and Rajan, V.S. Simple method for detecting penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae and Staphylococcus areus. British J. Veneral Dis. 55: 723-729, (1981).

Beta-lactamase production in bacteria isolated from cases of Caprine mastitis

Khan Nazer, A.H.[1], Jafari, M.[2]

[1]*Department of Food Hygine, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.* [2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.*

Prevalence of clinical and subclinical form of caprine mastitis, determination of different antibiotic resistant patterns along with the lactamase production exhibited by penicillin, amoxicillin, ampicillin, and cephalexin resistance strains isolated from cases of caprine mastitis were studied. The occurrence of subclinical and clinical mastitis was 26.8% and 2.4% respectively. A total of 55 isolates comprising coagulase positive Staphylococci (41.8%), coagulase negative Staphylococci (29%), Bacillus cereus (7.3%), E. coli (7.3%), alfahemolytic Streptococcus (3.6%), Micrococcus (3.6%), Neisseria meningococcus (1.8%), Enterobacter (1.8%), Pseudomonas multiphilia (1.8%) and Proteus (1.8%) strains were identified. Antibiotic sensitivity testing showed that between 0% (alfahemolytic Streptococcus, Micrococcus, Neisseria meningococcus, Proteus) and 100% (E. coli, Pseudomonas multiphilia, Enterobacter) were resistant to one or more antibiotics. The capillary method was able to detect lactamase production in 93.1% of isolates while the acidometric detected only 65.5% of isolates.

Key words : Mastitis, Goat, β Lactamase.