









Bi-quarterly Journal of  
Animal Health and Infectious Diseases

Volume 1, Number 1

Journal homepage: <https://jahid.lu.ac.ir/>

Molecular detection of genes (*tetM*, *tetO*, *tetL*) of *Streptococcus agalactiae* isolated from milk of goats and sheep of livestock farms around Tehran

Sepideh Assadi<sup>1</sup> , Shirin MohammadiPour<sup>2</sup> , Erfan ZohourianPordel<sup>3</sup> , MohammadHosein Ghaffari<sup>4</sup> ,  
Farzad Esfandiyar<sup>5</sup> , Bahar NayeriFasaei<sup>6</sup> 

1. Ph.D. in Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Ph.D. student of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Bahonar University, Kerman, Iran
3. DVM, student of Veterinary Medicine, Research Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. DVM, student of Veterinary Medicine, Research Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. DVM, student of veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Bahonar University, Kerman, Iran
6. Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

ABSTRACT

**Background and Aim:** The condition of inflammation of the mammary tissue, often referred to as mastitis which can occur due to various factors, with *Streptococcus agalactiae* being one of the significant microbial agents responsible for its development. It often causes treatment costs and premature culling. The present study aimed to investigate antibiotic resistance genes for oxytetracycline in *Streptococcus agalactiae* strains isolated from the milk of goats and sheep in the Tehran region.

**Materials and Methods:** A total of 240 milk samples from goats and sheep suffering from mastitis were collected from industrial farms around Tehran and cultured on blood agar medium. The grown colonies underwent standard phenotypic and biochemical tests. Subsequently, the antibiotic sensitivity of the isolates was studied using the Kirby-Bauer disk diffusion method. To confirm the identification of bacteria from pure cultures confirmed by biochemical tests, PCR was employed for *Streptococcus agalactiae*. Finally, the resistance genes (*tetO*, *tetM*, *tetL*) were examined.

**Results:** The results indicated that out of the total 240 milk samples, 8 samples (6.7%) and 14 samples (11.7%) were infected with *Streptococcus agalactiae* in goats and sheep, respectively. The investigation of antibiotic resistance genes revealed that all positive samples from sheep's milk contained resistance genes to oxytetracycline. Among the 8 positive samples in goat's milk, only 4 samples were found to contain the *tetM* gene.

**Conclusion:** Considering the presence of a high number of antibiotic resistance genes, proper use of antibiotics and continuous and rapid screening of this microorganism should receive more attention to prevent the emergence and spread of antibiotic-resistant *Streptococcus agalactiae* strains

**Keywords:** *Streptococcus agalactiae*, mastitis, cow, tetracycline

Received: 2023.10.09

Accepted: 2024.04.02

Published Online: 2024.09.02

Corresponding  
Information:

Sepideh Asadi, Ph.D. in Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: [sepidehasadi1394@yahoo.com](mailto:sepidehasadi1394@yahoo.com)



Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.

## دو فصلنامه

## بهداشت و بیماری های عفونی دام

سال ۱، شماره ۱

صفحه مجله: <https://jahid.lu.ac.ir/>

## جستجوی مولکولی ژن های ( *tetM*, *tetO*, *tetL* ) استرپتوکوکوس آگالاکتیه جداشده از شیر بز و گوسفند دامداری های اطراف تهران

سپیده اسدی<sup>۱</sup>، شیرین محمدی پور<sup>۲</sup>، عرفان ظهوریان پردل<sup>۳</sup>، محمدحسین غفاری<sup>۴</sup>، فرزاد اسفندیار<sup>۵</sup>، بهار نیری فسایی<sup>۶</sup>

۱. دکترای باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکترای باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه باهنر، کرمان، ایران
۳. دانشجوی دکترای دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. دانشجوی دکترای دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵. دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه باهنر، کرمان، ایران
۶. دانشیار گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

## چکیده

**زمینه و هدف:** به التهاب بافت پارانشیم غدد پستانی، ورم پستان گفته می شود. استرپتوکوکوس آگالاکتیه از مهم ترین عوامل میکروبی در ایجاد ورم پستان است. ورم پستان در اغلب موارد موجب، حذف زود هنگام و کاهش تولید می شود. پژوهش حاضر برای بررسی ژن های مقاومت به اکسی تتراسایکلین در استرپتوکوکوس آگالاکتیه جداشده از شیر ورم پستانی گوسفندان و بز از منطقه تهران انجام شده است.

**مواد و روش ها:** تعداد ۲۴۰ نمونه شیر بز و گوسفند مبتلا به ورم پستان از دامداری های صنعتی اطراف تهران جمع آوری شد و بر روی محیط کشت بلاد آگار کشت داده شد. پرگنه های رشد یافته، با کمک روش های متداول فنوتایپی و بیوشیمیایی بررسی شدند. در ادامه حساسیت آنتی بیوتیکی جدایه ها به روش انتشار از دیسک (Kirby Bauer) مطالعه شد. به منظور تأیید تشخیص جنس باکتری های از پرگنه های خالص تأیید شده با آزمایش های بیوشیمیایی، برای استرپتوکوکوس آگالاکتیه از PCR استفاده شد. در نهایت بررسی ژن های ( *tetO*, *tetM*, *tetL* ) مقاومت آنتی بیوتیکی بررسی شد.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که از مجموع تعداد ۲۴۰ نمونه شیر گوسفند و بز به ترتیب ۸ نمونه (۶/۷ درصد) و ۱۴ نمونه (۱۱/۷ درصد) آلوده به استرپتوکوکوس آگالاکتیه بودند. نتایج بررسی ژن های مقاومت به اکسی تتراسایکلین نشان داد، که تمام نمونه های مثبت شیر گوسفند حاوی ژن های مقاومت به اکسی تتراسایکلین بوده اند. در نهایت از تعداد ۸ نمونه مثبت در شیر بز فقط چهار نمونه حاوی ژن ( *tetM* ) بودند.

**نتیجه گیری:** با توجه به حضور فراوان ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی بیوتیک ها و غربالگری سریع و پیوسته این میکروارگانیسم، جهت جلوگیری از ظهور و گسترش استرپتوکوکوس آگالاکتیه های مقاوم، باید بیشتر بدان توجه شود.

**کلیدواژه ها:** استرپتوکوکوس آگالاکتیه، ورم پستان، گاو، تتراسایکلین

انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۱/۲۰

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵

دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۷

اطلاعات نویسنده مسئول: سپیده اسدی، دکترای باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: [sepidehasadi1394@yahoo.com](mailto:sepidehasadi1394@yahoo.com)



حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط

## مقدمه

بهداشت پستان در دام‌ها می‌تواند مؤثر باشد. اما عواملی مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند تهدیدی جدی علیه سلامت حیوانات و به دنبال آن سلامت جامعه داشته باشد. تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین معمولاً برای پیشگیری از عفونت‌های ورم پستان استفاده می‌شوند، اگر چه مقاومت در برابر این عوامل در بین سویه‌های GBS رایج شده است (۱۶، ۱۷). بدین منظور، در این پژوهش برای ارزیابی میزان باکتری‌های مقاوم، حضور ژن‌های مقاومت به Tet (*tetM*, *tetO*, *tetL*) در میان سویه‌های GBS جداسازی شده از شیر ورم پستانی گوسفندان و بزهای منطقه تهران بررسی شد.

## روش کار

### نمونه‌گیری

در این پژوهش به صورت تصادفی با توجه به شیوع ۵۰ درصدی بیماری ورم پستان تعداد ۱۲۰ نمونه شیر از گله بز و گوسفند، بعد از معاینات اولیه بالینی طی بهار سال ۱۴۰۰ از دامداری‌های صنعتی اطراف تهران جمع‌آوری شد و پس از گرفتن اطلاعات مربوط به هر حیوان از لحاظ سلامت و ابتلا به ورم پستان و همچنین سن و تعداد زایمان‌های موفق و غیر موفق هر حیوان، ۱۵ میلی‌لیتر خون درون ظرف استریل برچسب دار تهیه شد و در مجاورت یخ و در فاصله زمانی کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، انتقال داده شد.

### مطالعات فنوتایپی و بیوشیمیایی

به منظور جداسازی استرپتوکوکوس آگالاکتیه، کشت باکتری از تمامی نمونه‌های شیر بر روی محیط بلاد آگار (Blood Agar) انجام و پس از طی ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نسبت به شناسایی اولیه پرگنه‌های رشد یافته با استفاده از روش‌های متداول فنوتایپی و بیوشیمیایی، از جمله تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و تست کمپ بر اساس روش‌های روتین باکتری‌شناسی انجام شد. سپس جدایه‌های باکتریایی به دست آمده در گلیسرول ۳۰ درصد و در ۷۰-

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌عنوان چالش مهمی در حوزه دامپزشکی، مسئله‌ای جدی و نگران‌کننده برای صنعت دامداری و بهداشت عمومی جامعه ایجاد کرده است (۱). در دهه‌های اخیر با توجه به افزایش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان و پیشگیری از بیماری‌های دامی، به یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های بهداشت دامی و انسانی تبدیل شده است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در دام‌ها می‌تواند در تداوم و گسترش عفونت‌های باکتریایی تأثیرگذار باشد و به‌طور مستقیم غیرمستقیم به انتقال این باکتری‌های مقاوم به انسان‌ها، منجر شود. یکی از باکتری‌هایی که به‌عنوان عامل ایجادکننده عفونت‌های مهم در دام‌ها شناخته می‌شود و ممکن است به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم شود، باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae*) که عامل بیماری‌های مختلفی، از جمله ورم پستان است، می‌باشد (۲). همچنین، باعث عفونت‌های جدی در انسان نیز می‌شود (۳-۵). ورم پستان یک واکنش التهابی غده پستانی است که در نتیجه ورود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به پستان و سپس تکثیر و تولید توکسین به وسیله آن‌ها، بروز می‌یابد (۶). در سراسر جهان، ورم پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های دام‌های تولیدکننده شیر و مهم‌ترین بیماری در صنعت لبنیات از نظر اقتصادی است که سلامت حیوانات و بهره‌وری مزرعه را مختل می‌کند (۷، ۸). استرپتوکوکوس آگالاکتیه (*Streptococcus agalactiae*) یا استرپتوکوک‌های گروه B (GBS)، گونه‌ای بتاهمولیتیک از استرپتوکوک است که براساس تنوع آنتی‌ژنی در پلی ساکارید کپسولی به ۱۰ سروتیپ طبقه‌بندی می‌شود [۹، ۱۰]. این باکتری مانند سایر باکتری‌های گرم مثبت، می‌تواند ساختارهای سه بعدی بیو فیلم مانند را ایجاد کند که می‌تواند توانایی آن را برای ماندگاری و شدت عفونت در میزبان افزایش دهد (۱۱-۱۳). به همین علت تحقیقات بسیار گسترده‌ای در حوزه این باکتری و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن، در سراسر دنیا، از جمله ایران انجام شده است (۱۴، ۱۵).

بنابراین، تشخیص دقیق و سریع عفونت ورم پستان باکتریایی به وسیله استرپتوکوکوس آگالاکتیه بسیار حائز اهمیت است. درمان به موقع می‌تواند از تعداد موارد و شدت عوارض جلوگیری کرده و بهداشت و بهره‌وری دام‌ها را تضمین کند. علاوه بر این، پیشگیری از ابتلا به این نوع عفونت‌ها از طریق مدیریت مناسب و رعایت استانداردهای

[۲۰]	207bp	16SrRNA	CGGTGCCTAATACATGCAA	استرپتوکوکوس آگلایکتیه
			TACAACGCAGGTCCATCT	

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای به کار رفته برای آزمون PCR

الکتروفورز محصولات PCR به وسیله دستگاه الکتروفورز (Bio-Rad, USA) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ (SinaClon, Iran) و با استفاده از رنگ Safe Stain (SinaClon, Iran) انجام شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داگ (Bio-Rad, USA) بررسی شد.

### آزمایشات مولکولی جهت شناسایی ژن‌های مقاومت *tetM*، *tetL*، *tetO*

برای انجام آزمایش از پرایمرهای اختصاصی تهیه شده از شرکت سینا کلون استفاده شد. ردیف بازهای پرایمر و اندازه محصول در جدول شماره ۲ گزارش شده است. برای انجام آزمایش PCR غلظت بهینه مواد به کار رفته در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و سه میکرو لیتر از DNA استخراج شده، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر و ۱۲/۵ میکرولیتر mastermix2x آماده حاوی (TaqDNApolymerase, Mgcl2dNTPreacationbuffer) و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل جهت انجام واکنش PCR با یکدیگر مخلوط شدند و در یک میکروتیوب ۱.۵ میلی لیتر مخصوص PCR گذاشته همچنین از آب مقطر دیونیزه برای کنترل منفی و از سویه ATCC13813) برای کنترل مثبت استفاده شد

منبع	اندازه محصول	نام ژن	توالی پرایمر 5'-3'	باکتری
[21]	۱۷۲۳	<i>tetO</i>	AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC	استرپتوکوکوس آگلایکتیه
			CGGGCGGGTGGCAAATA	
	۱۰۷۷	<i>tetL</i>	ATAAATGTTCGGGTCGGTAAT	
			AACCAGCCAATAATGACAATGAT	
[22]	۳۵۹	<i>tetM</i>	GTGGAGTACTACATTACGAG	
			GAAGCGGATCACTATCTGAG	

جدول ۲: پرایمرهای به کار رفته در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ردیابی ژن‌های *tetO*, *tetM*, *tetL*

### نتایج

#### نتایج باکتری شناسی فنوتایپینگ و بیوشیمیایی

نتایج به دست آمده از کشت بر روی محیط بلاداآگار از تعداد ۲۴۰ نمونه شیر گوسفند و بز جمع‌آوری شده به ترتیب ۸ و ۱۴ نمونه باکتری استرپتوکوکوس آگلایکتیه شناسایی و جداسازی شد. در رنگ آمیزی گرم پرگنه‌های خالص از نوع کوکسی زنجیره‌ای گرم مثبت بودند. تمامی

درجه سانتی‌گراد ذخیره و برای آزمایشات مولکولار (PCR) و تشخیص نهایی استفاده شد (۱۸، ۱۹).

### تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی (روش انتشار در آگار)

حساسیت جدایه‌ها به روش انتشار از دیسک کربی بائر (Kirby-Bauer)، انجام شد برای این کار ابتدا از باکتری‌ها کشت ۲۴ ساعته در محیط Blood Agar، تهیه و سپس با تهیه سوسپانسیون باکتری از پرگنه‌های رشد یافته در سرم فیزیولوژی استریل غلظت معادل نیم مک فارلند تهیه شد، سپس با استفاده از سوآپ استریل روی محیط Blood Agar، کشت چمنی انجام و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (شرکت پادتن طب) روی محیط با فواصل مناسب قرار داده شد. پلیت‌های محیط کشت به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و قطر هاله ممانعت از رشد تعیین شد. بر اساس استاندارد شرکت خریداری شده مقادیر حساس، نیمه حساس و مقاوم برای جنس باکتریایی و هر آنتی‌بیوتیک انجام شد. آنتی‌بیوتیک‌های به کار رفته تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) و اکسی تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) بودند (۱۸).

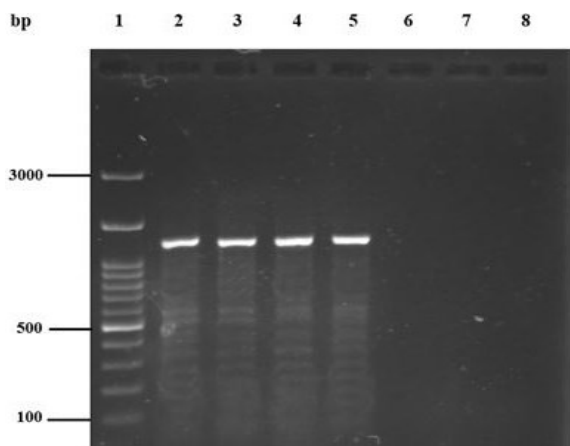
### آزمایشات مولکولی

به منظور تأیید تشخیص جنس به دست آمده از پرگنه‌های خالص تأیید شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی، برای استرپتوکوکوس آگلایکتیه از آزمایش PCR استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سینا کلون (SinaClon, Iran) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکتوفوتومتری با طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد. نمونه‌های DNA استخراج شده تا زمان PCR در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای انجام آزمایش PCR، غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش PCR، در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۹ میکرومولار از مسترمیکس (SinaClon, Iran)، یک میکرومولار از هر پرایمر (SinaClon, Iran)، دو میکروگرم DNA از هر نمونه و باقی‌مانده حجم از آب استریل استفاده شد. در پژوهش حاضر از سویه استاندارد آزمایشگاهی استرپتوکوکوس آگلایکتیه گرفته شده از بخش میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. توالی پرایمرها و اندازه محصول جهت شناسایی ژن *16SrRNA* استرپتوکوکوس آگلایکتیه در جدول ۱ آورده شده است.

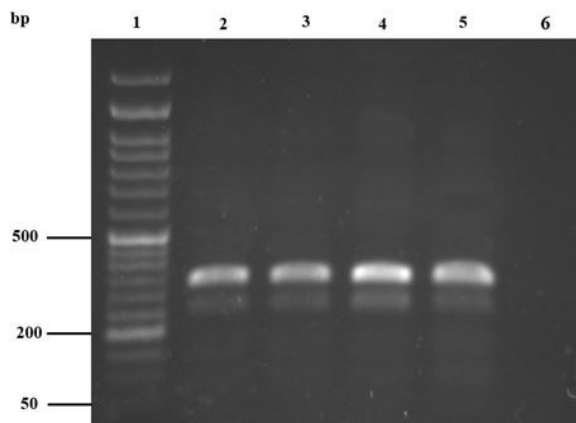
منبع	اندازه محصول	نام ژن	توالی پرایمر 5'-3'	باکتری
------	--------------	--------	--------------------	--------

## نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی براساس ژن‌های *tetO*، *tetM* و *tetL*

به منظور تأیید نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی به اکسی تتراسایکلین از پرایمرهای ژن‌های (*tetO*، *tetL* و *tetM*) استفاده شد. نتایج نشان داد چهار نمونه مثبت شیر گوسفند از نظر وجود ژن‌های آورده مثبت اند. همچنین از تعداد ۷ نمونه مثبت شیر بز فقط دو نمونه مقاومت براساس ژن *tetM* را نشان داد. نتایج ژل الکتروفورز در شکل‌های (۳، ۴ و ۵) نشان داده شده است.



تصویر ۳: محصول PCR ژن *tet-O* چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، چاهک‌های ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های مثبت، چاهک ۸: نمونه کنترل منفی، چاهک‌های ۶، ۷: نمونه‌های منفی



تصویر ۴: محصول PCR ژن *tet-L* چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، چاهک‌های ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های مثبت، چاهک ۸: نمونه کنترل منفی، چاهک‌های ۶، ۷: نمونه‌های منفی

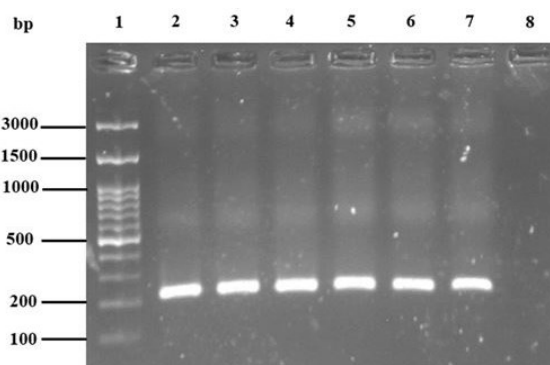
جدایه‌های برآمده از کشت در محیط بلاد آگار با استفاده از آزمایشات کاتالاز و کمپ بررسی شدند. بر اساس داده‌های نوتایی و بیوشیمیایی این جدایه‌ها در جنس *استرپتوکوکوس* قرار گرفت.

## نتایج آزمایش آنتی بیوگرام

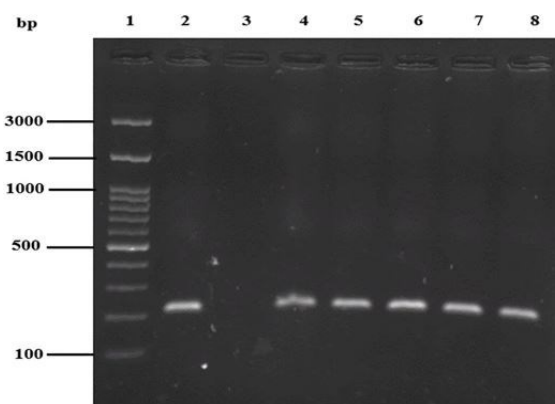
الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی برآمده از آزمایش آنتی بیوگرام در کل از چهار جدایه جدا شده از نمونه شیر ورم پستانی گوسفند، از نظر فنوتیپی، همگی به تتراسایکلین نیمه حساس و به اکسی تتراسایکلین مقاوم بودند. از ۸ جدایه جدا شده از نمونه شیر بز، همگی به تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین حساس بودند.

## نتایج مطالعات مولکولی (PCR)

نتایج مطالعات مولکولی منجر به شناسایی ۲۲ جدایه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از بین ۲۲ نمونه جداسازی شده با روش بیوشیمیایی شد. تصاویر الکتروفورز مربوط به نتایج PCR در تصاویر ۱ و ۲ آورده شده است. باند مورد انتظار *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* برآمده از تکثیر ژن *16SrRNA* (۲۰۷ جفت باز) بود



تصویر ۱: الکتروفورز مربوط به ژن *16SrRNA* استرپتوکوکوس آگالاکتیه نمونه‌های بز، چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، چاهک‌های ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸: نمونه‌های مثبت

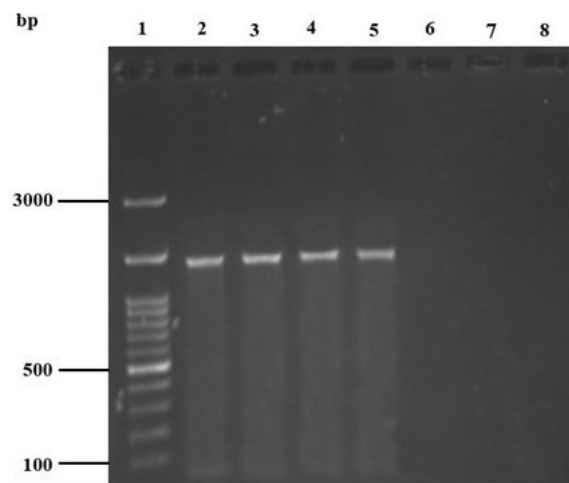


تصویر ۲: الکتروفورز مربوط به ژن *16SrRNA* استرپتوکوکوس آگالاکتیه نمونه‌های گوسفند. چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ bp، چاهک‌های ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸: نمونه‌های مثبت

مقاوم به تتراسایکلین شناسایی شدند، مشابه نتایج به دست آمده در چندین ایالت در کشور آمریکا و در آلمان گزارش شده است (۲۴، ۲۵). گسترش چشمگیر جدایه‌های عامل ورم پستان مقاوم به تتراسایکلین و اریترومايسين نشان دهنده محدودیت استفاده درمانی از این ضد میکروبی‌ها برای درمان گاوهای آلوده است و نشان می‌دهد که اقدامات کنترل و پیشگیری، از جمله کنترل استفاده از داروهای ضد میکروبی، ممکن است مؤثر انجام نشده باشد. از سوی دیگر، حساسیت یکسان به آمپی‌سیلین این مفهوم را تأیید می‌کند که بتالاکتام‌ها هنوز گزینه‌ها پیشگیری و درمانی خوبی را تشکیل می‌دهند؛ زیرا مقاومت به این عوامل ضد میکروبی در سویه‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه ظاهر نشده است.

در پژوهش راتو و همکاران (۲۰۱۳)، مقاومت به سفازولین و سفوپرازون تأیید شد (۲۷). همچنین در پژوهش Lindeman و همکاران (۲۰۱۳)، میزان گسترده‌ای از حساسیت به سفتیوفور و سفالوتین در بین جدایه‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه از گاوهای شیری منطقه آمریکای شمالی تشخیص داده شد (۲۸). میزان حساسیت زیاد پنی‌سیلین در مطالعات قبلی در جدایه‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه در گاوهای مبتلا به ورم پستان تأیید شده است. در پژوهش راتو و همکاران، بیشتر جدایه‌ها (۹۶/۶ درصد) به پنی‌سیلین حساس بودند، که نشان می‌دهد این آنتی‌بیوتیک گزینه مناسبی برای درمان ورم پستان است. در انسان پنی‌سیلین به عنوان خط اول در درمان عفونت‌های ناشی از استرپتوکوکوس آگالاکتیه برای تمام گروه‌های سنی پیشنهاد شده است. علاوه بر این به طور پیشگیرانه برای زنان باردار تجویز می‌شود (۲۷-۲۹).

در پژوهش گائو و همکاران (۲۰۱۲)، سطوح متغیری از مقاومت به جنتامایسین در ایزوله‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه گاو تأیید شده است (۳۰). در این پژوهش ۲۹/۴ درصد ایزوله‌ها به جنتامایسین مقاوم بودند. در صورتی که در پژوهش دیگری که Duarte و همکارانش (۲۰۰۴)، انجام دادند ۸۵ درصد ایزوله‌های جدا شده از گاوهای شیری کشور برزیل به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند (۳۱). علاوه بر این راتو و همکاران (۲۰۱۳) میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در بین ۱۰۸ ایزوله جدا شده از گاوهای کشور پرتغال را ۸۰/۶ درصد گزارش دادند (۲۷). نتایج پژوهش حاضر از این نظر تا حدودی متفاوت است، با توجه به اینکه تنها ۹/۳ درصد از سویه‌های مورد آزمایش به جنتامایسین مقاوم بودند، در حالی که ۳۸/۱ درصد به آمیکاسین، آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزید دیگر مقاوم بودند. در پژوهش مائور و همکاران (۲۰۱۰)، عوامل تعیین کننده مقاومت تتراسایکلین *tetO* و *tetM* در سویه‌های مورد بررسی بسیار مشابه بودند (به ترتیب ۱۹/۵ درصد و ۲۰/۳ درصد) که هر دو این‌ها با مقاومت فنوتیپی مرتبط بودند.



تصویر ۵: محصول PCR ژن *tet-M* چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۵۰ bp (پیشگام، ایران)، چاهک‌های ۲: کنترل مثبت، چاهک ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های مثبت، چاهک ۶: نمونه کنترل منفی

## بحث

ورم پستان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گاوهای شیری است که زیان‌های اقتصادی ناشی از آن چشمگیرند و سهم قابل توجهی از هزینه‌های درمانی گاو‌داری‌ها را به خود اختصاص می‌دهند. متداول‌ترین شکل ورم پستان، موارد تحت بالینی است که بیشترین خسارت را به صنعت دام پروری وارد می‌کند. ورم پستان بالینی که به شکل حاد بروز می‌کند، نیز حائز اهمیت است و میزان وقوع آن در گاو‌داری‌ها و مطالعات مختلف گزارش شده است، از این روی میزان خسارت‌های ناشی از آن در کشورهای مختلف اهمیت ویژه‌ای دارد (۲۳).

در این راستا، پژوهش‌های مختلفی در نقاط مختلف جهان بر روی گاوهای شیری انجام شده است و آلودگی‌های باکتریایی گوناگونی در گاوهای دچار بیماری ورم پستان گزارش شده است. نتایج باکتری شناسی گاوهای بررسی شده نشان دهنده باکتری‌های معمولی است که به طور رایج از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی ایران جدا می‌شود. در این پژوهش به ترتیب ۸ نمونه از نمونه‌های گوسفندان و ۱۴ نمونه از نمونه بز آلوده به استرپتوکوکوس آگالاکتیه بودند.

در دهه گذشته، تعدادی گزارش درباره حساسیت ضد میکروبی در عوامل ایجاد کننده ورم پستان از منابع دام پزشکی منتشر شده است (۲۴-۲۶). داده‌های مربوط به حساسیت ضد میکروبی برای نظارت بر ظهور صفات مقاومتی و برای هدایت انتخاب یک درمان معقول تر و مؤثرتر ارزشمند است. در پژوهش حاضر، مقاومت به تتراسایکلین در جدایه‌های جدا شده در گوسفند (۶ درصد) و در جدایه‌های جدا شده از شیر بز (۴ درصد) است. میزان مقاومت موجود در این پژوهش بیشتر از مواردی بود که به تازگی در گله‌های گاوی در کشور فرانسه شناسایی شده است (۲۶). ژن‌های *tetM* و *tetO* به عنوان شایع‌ترین جدایه‌های

## نتیجه گیری

این پژوهش در استان تهران، به منظور شناسایی استرپتوکوکوس آگالاکتیه مقاوم به اکسی تتراسایکلین در گوسفند و بز به مبتلا به ورم پستان انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که استرپتوکوکوس آگالاکتیه یکی از مهم ترین اجرام عامل ورم پستان در گوسفند و بز منطقه تهران است. مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه های استرپتوکوکوس آگالاکتیه در این تحقیق مشاهده شد. با توجه به حضور ژن های مورد مطالعه و در صورت فراهم شدن شرایط بیان ژن، مقاومت فنوتیپی در درصد بالایی از جدایه ها قابل پیش بینی است. بنابراین استفاده صحیح از آنتی بیوتیک ها و غربالگری سریع و پیوسته این میکروارگانیسم جهت جلوگیری از ظهور و گسترش استرپتوکوکوس آگالاکتیه های مقاوم باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

## منابع

1. Levy, S.B., *The challenge of antibiotic resistance*. Scientific American, 1998. 278(3): p. 46-53.
2. Poyart, C., et al., *Genetic Basis of Antibiotic Resistance in <i>Streptococcusagalactiae</i> Strains Isolated in a French Hospital*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. 47(2): p. 794-797.
3. Furfaro, L.L., B.J. Chang, and M.S. Payne, *Perinatal Streptococcus agalactiae epidemiology and surveillance targets*. Clinical microbiology reviews, 2018. 31(4): p. 10.1128/cmr. 00049-18.
4. Seale, A.C., et al., *Maternal colonization with Streptococcus agalactiae and associated stillbirth and neonatal disease in coastal Kenya*. Nature microbiology, 2016. 1(7): p. 1-10.
5. Sambola, A., et al., *Streptococcus agalactiae Infective Endocarditis: Analysis of 30 Cases and Review of the Literature, 1962–1998*. Clinical Infectious Diseases, 2002. 34(12): p. 1576-1584.
6. Basdew, I. and M. Laing, *Mini-Review: Biological control of bovine mastitis using bacteriophage therapy*. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 2011: p. 386-393.
7. Richards, V.P., et al., *Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted Streptococcus agalactiae*. Infection, Genetics and Evolution, 2011: (6) 11. p. 1263-1275.
8. Radtke, A., et al., *Multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) is a useful tool for molecular epidemiologic analysis of Streptococcus agalactiae strains causing bovine mastitis*. Veterinary microbiology, 2012. 157(3-4): p. 398-404.

در پژوهش های متعددی ژن های *tet* رایج ترین ژن های شناسایی شده در بین جدایه های استرپتوکوکوس آگالاکتیه در گاو و انسان بوده اند (۱۷، ۳۲، ۳۳). اما دیگر عوامل مانند *tetS* و *tetK* کمتر مشاهده شده اند (۲۷، ۳۱). در پژوهش راتو و همکاران، چهار جدایه مقاومت فنوتیپی به تتراسایکلین نشان داده اند، هیچ کدام از ژن های *tetM* و *tetO* را نشان ندادند که می تواند نشان دهنده وجود دیگر ژن های *tet*، مانند *tetS* و *tetK* باشد (۲۷). حمل و نقل *tetO* و *tetM*، فرضیه ای است که قبلاً به دست Duarte و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده است، در این مطالعه چهار جدایه دارای این ژن ها بودند (۳۱). در این مطالعه ۸ جدایه حساس به تتراسایکلین، حامل یک یا هر دوی این ژن ها بودند. دلایلی که ژن های مقاومت همیشه بیان نمی شوند، این است که نیاز به ارزیابی بیشتر دارند. دلایل احتمالی، می تواند شامل فقدان پروموتور *roo* و وجود جهش در ژن های مورد بررسی باشد.

بر اهمیت بررسی ژنتیکی دخیل در مقاومت به تتراسایکلین، در گزارش های قبلی تأکید شده است؛ زیرا ژن های *tet* اغلب در عناصر ژنتیکی متحرک یافت می شوند که مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامیدها و کلرامفنیکل را نیز رمزگذاری می کنند (۳۴). شیوع کم ژن های مقاومت به تتراسایکلین، می تواند به علت جهش در ناحیه اتصال پرایمر باشد که می تواند منجر به نتیجه منفی کاذب شود. همچنین، مقاومت به تتراسایکلین می تواند به علت ژن های مقاومت دیگری باشد که تاکنون در استرپتوکوکوس آگالاکتیه جدا نشده اند.

پرلگ و همکاران در پژوهشی ثابت کردند که مقاومت به تتراسایکلین از والدین به نوزادان به صورت افقی و با باکتری های فلور انتقال می یابد. بنابراین مصرف شیرهای آلوده به استرپتوکوکوس های مقاوم به اکسی تتراسایکلین و تتراسایکلین می تواند از نظر بهداشت عمومی و انتقال ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی مطرح باشد.

در پژوهش کرمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در همدان میزان مقاومت سویه های انتروپاتوژنیک / شیرشیا کلی نسبت به تتراسایکلین ۵۸/۴ درصد گزارش شده است که نسبت به پژوهش حاضر شیوع سویه های مقاوم بیشتر است (۳۵). از طرفی بعضی از مقاومت ها به جای کسب ژن می تواند بر اساس جهش های ایجاد شده در بخش *16SrRNA* ایجاد شود که در نتیجه شناسایی عوامل ژنتیکی مقاومت در این موارد قابل ردیابی نیست.

با توجه به نتایج به دست آمده و دستاوردهای پیشین، مقاومت اندکی به آنتی بیوتیک مد نظر گزارش شده است، اما امروزه به دلیل گسترش کاست های ژنی مقاوم در آن ها مقاومت به این آنتی بیوتیک به شدت در حال افزایش است. در بعضی از کشورها از جمله آمریکا این آنتی بیوتیک به عنوان فاکتور رشد در دوزهای کمتر از درمان به غذای دام اضافه می شود.

21. Duarte, R.S., et al., *Phenotypic and molecular characteristics of Streptococcus agalactiae isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil*. J Clin Microbiol, 2004. 42(9): p. 4214-22.
22. Silva, J., et al., *In vitro antimicrobial susceptibility and genetic resistance determinants of Streptococcus agalactiae isolated from mastitic cows in Brazilian dairy herds*. Semina: Ciências Agrárias, 2017. 38: p. 2581.
23. Momtaz, H., et al., *Molecular detection of Streptococcus uberis and Streptococcus agalactiae in the mastitic cows milks in Isfahan province*. Biological Journal of Microorganism, 2012. 1(2): p. 71-76.
24. Brown, M. and M. Roberts, *Tetracycline resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland*. Veterinary microbiology, 1991. 29(2): p. 173-180.
25. Schwarz, S., I. Wibawan, and C. Lämmler, *Distribution of genes conferring combined resistance to tetracycline and minocycline among group B streptococcal isolates from humans and various animals*. Zentralblatt für Bakteriologie, 1994. 281(4): p. 526-533.
26. Guérin-Faubleé, V., et al., *Antimicrobial susceptibility of Streptococcus species isolated from clinical mastitis in dairy cows*. International journal of antimicrobial agents, 2002. 19(3): p. 219-226.
27. Rato, M.G., et al., *Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis*. Veterinary microbiology, 2013. 161(3-4): p. 286-294.
28. Lindeman, C.J., et al., *Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002–2010*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2013. 25 (5): p. 581-591.
29. Bolukaoto, J.Y., et al., *Antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa*. BMC research notes, 2015. 8(1): p. 1-7.
30. Gao, J., et al., *Antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae from cows with mastitis*. The Veterinary Journal, 2012. 194(3): p. 423-424.
31. Duarte, R.S., et al., *Phenotypic and molecular characteristics of Streptococcus agalactiae isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil*. Journal of clinical microbiology, 2004. 42(9): p. 4214-4222.
32. Duarte, R.S., et al., *Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human*
9. Breeding, K.M., et al., *Real-time PCR-based serotyping of Streptococcus agalactiae*. Scientific reports, 2016. 6(1): p. 38523.
10. Imperi, M., et al., *A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of Streptococcus agalactiae*. Journal of microbiological methods, 2010. 80(2): p. 212-214.
11. Rosini, R. and I. Margarit, *Biofilm formation by Streptococcus agalactiae: influence of environmental conditions and implicated virulence factors*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2015. 5: p. 6.
12. Ebrahimi, A., et al. *Biofilm formation, hemolysin production and antimicrobial susceptibilities of Streptococcus agalactiae isolated from the mastitis milk of dairy cows in Shahrekord district, Iran*. in *Veterinary Research Forum: an International Quarterly Journal*. 2013. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
13. Miranda, P., et al., *Biofilm formation on different pH conditions by Streptococcus agalactiae isolated from bovine mastitic milk*. Letters in Applied Microbiology, 2018. 67(3): p. 235-243.
14. Moatamedih, et al., *A polymerase chain reaction based study on the subclinical mastitis caused by Streptococcus agalactiae, S. dysgalactiae and S. uberis in cattle in Ahvaz*. Iranian Journal of Veterinary Research, 2007. 8(3): 260-265.
15. Reza R., et al., *Antibacterial effect of essential oils of peppermint and pennyroyal on major bovine mastitis bacteria*. New Findings in Veterinary Microbiology, 2023; 1(6): 64-75.
16. Pinto, T.C.A., et al., *Conjugative transfer of resistance determinants among human and bovine Streptococcus agalactiae*. Brazilian Journal of Microbiology, 2014. 45: p. 785-789.
17. Dogan, B., et al., *Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among Streptococcus agalactiae isolates from bovine and human hosts*. Journal of clinical microbiology, 2005. 43(12): p. 5899-5906.
18. Soltani M., et al., *Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria the Causative Agents of Bacterial Diseases in Farmed Rainbow Trout (Onchorhynchus mykiss) in Iran*. Journal of Veterinary Research, 2023; 2 (78): 5-9.
19. Asadi, S., et al., *Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against Escherichia coli*. BMC Microbiology, 2023. 23(1): p. 55.
20. Meiri-Bendek, I., et al., *A PCR-Based Method for the Detection of Streptococcus agalactiae in Milk*. Journal of Dairy Science, 2002. 85(7): p. 1717-1723.



sources. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. 49 : (1) p. 97-103.

33. Dutra, V.G., et al., *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC infectious diseases, 2014. 14: p. 1-9.

34. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. Microbiology and molecular biology reviews, 2001. 65(2): p. 232-260.

35. Karami P. et al., Determination Pattern of Antibiotic Resistance in Entropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Children with Diarrhea. Avicenna Journal Clinical Medicine, 2012; 19(1): 27-31.