Animal health and infectious diseases
Volume 1, Issue 1
Journal homepage: https://jahid.lu.ac.ir/

Molecular detection for genes (*tet*M, *tet*O, *tet*L) of Streptococcus agalactiae isolated from goat and sheep milk from livestock farms around Tehran

Sepideh Assadi [1], Shirin MohammadiPour [2], Erfan ZohourianPordel [3], MohammadHosein Ghaffari [4], Farzad Esfandiyar [5], Bahar NayeriFasaei [6]

1. Ph.D. in Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Ph.D. student of Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Bahnar University, Kerman, Iran
3. PhD student in Veterinary Medicine, Research Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. PhD student in Veterinary Medicine, Research Sciences Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. PhD student in veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Bahnar 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 KirbyBauer 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 (*tet*O, *tet*M, *tet*L) 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 agalactie*, Mastitis, Cow, Tetracycline

Received:2023.11.08 **Accepted:** 2024.04.02 **Final Edit:** 2024.06.02 **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

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.

بهداشت و بیماری های عفونی دام
شماره ۱، دوره ۱
صفحه مجله: https://jahid.lu.ac.ir/

جست‌جوی مولکولی ژن‌های (*tetM, tetO, tetL*) *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* جداشده از شیر بز و گوسفند دامداری‌های اطراف تهران

سپیده اسدی[1*]، شیرین محمدی پور[2]، عرفان ظهوریان پردل[3]، محمدحسین غفاری[4]، فرزاد اسفندیار[5]، بهار نیری فسایی[6]

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 تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. دانشجوی دکترای دامپزشکی، واحد علوم 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 می‌شود. *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از مهم‌ترین عوامل میکروبی در ایجاد ورم پستان است. ورم پستان در اغلب موارد موجب، حذف زود هنگام و کاهش تولید می‌شود. پژوهش حاضر برای بررسی ژن‌های مقاومت به اکسی‌تتراسایکلین در *استرپتوکوکوس آگالاکتیهٔ* جداشده از شیرِ ورم پستانی گوسفندان و بزان منطقهٔ تهران انجام شده است.

مواد و روش ها: تعداد ۲۴۰ نمونه شیر بز و گوسفند مبتلا به ورم پستان از دامداری‌های صنعتی اطراف تهران جمع‌آوری شد و بر روی محیط کشت بلاد آگار کشت داده شد. پرگنه‌های رشدیافته، با کمک روش‌های متداول فنوتایپی و بیوشیمیایی بررسی شدند. در ادامه حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به‌روش انتشار از دیسک (Kirby Bauer) مطالعه شد. به منظور تأیید تشخیص جنس باکتری‌های از پرگنه‌های خالص تأییدشده با آزمایش‌های بیوشیمیایی، برای *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از PCR استفاده شد و در نهایت بررسی ژهای (*tetL*، *tetM*، tetO) مقاومت آنتی‌بیوتیکی 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 ژن‌های مقاومت به اکسی‌تتراسایکلین نشان داد، که تمام نمونه‌های مثبت شیر گوسفند حاوی ژن‌های مقاومت به اکسی‌تتراسایکلین بوده‌اند. درنهایت از تعداد ۸ نمونه مثبت در شیر بز فقط چهار نمونه حاوی ژن (*tetM*) بودند.

نتیجه گیری: با توجه به حضور فراوان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و غربالگری سریع و پیوستهٔ 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

دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵ ویرایش نهایی:۱۴۰۲/۱۱/۲۰ انتشار آنلاین: ۱۴۰۲/۱۱/۲۰

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

Email: sepidehasadi1394@yahoo.com

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد مطالب را فقط در استفاده غیرتجاری با استناد مناسب می دهد.

مقدمه

مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، به‌عنوان چالش مهمی در حوزهٔ دام‌پزشکی، مسئله‌ای جدی و نگران کننده 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 مستقیما غیرمستقیم به انتقال این باکتری‌های مقاوم به انسان‌ها، منجر شود. یکی از باکتری‌هایی که به‌عنوان عامل ایجادکنندهٔ 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 التهابیِ غدهٔ پستانی است که درنتیجهٔ ورود میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به پستان و سپس تکثیر و تولید توکسین به وسیلهٔ آن‌ها، بروز می‌یابد (۶). در سراسر جهان، ورم پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های، دام‌های تولیدکنندهٔ 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 *استرپتوکوک*‌های 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 مانندی 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 حوزهٔ این باکتری و مقاومت آنتی بیوتیکی آن، در سراسر دنیا، از جمله ایران انجام شده است (۱۴، ۱۵).

بنابراین، تشخیص دقیق و سریع عفونت ورم پستان باکتریایی به وسیلهٔ *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* بسیار حائز اهمیت است. درمان به موقع می‌تواند از تعداد موارد و شدت عوارض جلوگیری کرده و بهداشت و بهره وری دام‌ها را تضمین کند. علاوه بر این، پیشگیری از ابتلا به این نوع عفونت‌ها از طریق مدیریت مناسب و رعایت استانداردهای 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 اکسی تتراسایکلین 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(*tet*M, *tet*O, *tet*L) در میان سویه‌های GBS جداشده 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 گلهٔ بز و گوسفند، بعد از معاینات اولیه بالینی طی بهارِ 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 فاصلهٔ زمانی کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکدهٔ 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 اولیهٔ 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– درجه سانتی‌گراد ذخیره و برای آزمایشات مولکولار (PCR) و تشخیص نهایی استفاده شد (۱۸، ۱۹).

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی (روش انتشار در آگار)

حساسیت جدایه‌ها به‌روش 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 تهیهٔ سوسپانسیون باکتری از پرگنه‌های رشد یافته در سرم فیزیولوژی استریل غلظت معادل نیم مک فارلند تهیه شد، سپس با استفاده از سواپ استریل روی محیط Blood Agar، کشت چمنی انجام و دیسک‌های آنتی بیوتیکی (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 عدم رشد تعیین شد. بر اساس استاندارد شرکت خریداری شده مقادیر حساس، نیمه حساس و مقاوم برای جنس باکتریایی و هر آنتی‌بیوتیک انجام شد. آنتی‌بیوتیک های 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 آگالاکتیه* از آزمایش PCR استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت سینا کلون (SinaClon, Iran) استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده به روش اسپکتوفتومتری 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 بهینهٔ 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 باقی‌ماندهٔ حجم از آب استریل استفاده شد. در پژوهش حاضر از سویهٔ استاندارد آزمایشگاهی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* گرفته شده از بخش میکروبیولوژی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تهران، به عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. توالی پرایمرها و اندازهٔ محصول جهت شناسایی ژن *16SrRNA استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در جدول ۱ آورده شده است.

باکتری	توالی پرایمر 5′-3′	نام ژن	اندازه محصول	منبع
استرپتوکوکوس آگالاکتیه	GCGTGCCTAATACATGCAA	16SrRNA	207bp	[۲۰]
	TACAACGCAGGTCCATCT			

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای به کار رفته برای آزمون PCR

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

آزمایشات مولکولی جهت شناسایی ژن‌های مقاومت tetO ،tetL ، tetM

برای انجام آزمایش از پرایمرهای اختصاصی تهیه شده از شرکت سینا کلون استفاده شد. ردیف بازهای پرایمر و اندازهٔ محصول در جدول شماره ۲ گزارش شده است. برای انجام آزمایش PCR غلظت بهینهٔ 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,Mgcl2dNTPreactionbuffer) 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

باکتری	توالی پرایمر 5′-3′	نام ژن	اندازه محصول	منبع
استرپتوکوکوس آگالاکتیه	AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC	*tetO*	۱۷۲۳	[21]
	CGGCGGGGTTGGCAAATA			
	ATAAATTGTTTCGGGTCGGTAAT	*tetL*	۱۰۷۷	
	AACCAGCCAACTAATGACAATGAT			
	GTGGAGTACTACATTTACGAG	*tetM*	۳۵۹	[22]
	GAAGCGGATCACTATCTGAG			

جدول۲: پرایمرهای به کار رفته در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ردیابی ژن‌های tetO ,tetM ,tetL

نتایج

نتایج باکتری شناسی فنوتایپینگ و بیوشیمیایی

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

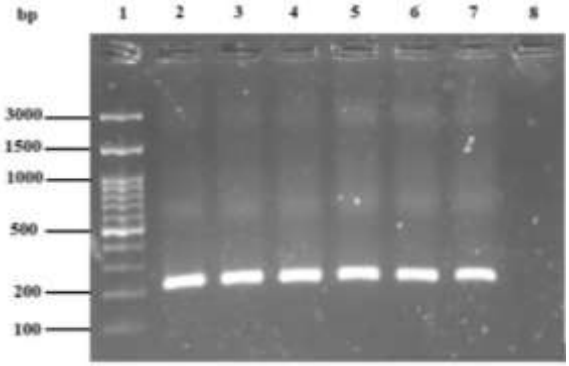
جدایه های بر آمده از کشت در محیط بلاد آگار با استفاده از آزمایشات کاتالازو کمپ بررسی شدند. بر اساس داده هایف نوتایپی و بیوشیمیایی این جدایه‌ها در جنس *استرپتوکوکوس* قرار گرفت.

نتایج آزمایش آنتی بیوگرام

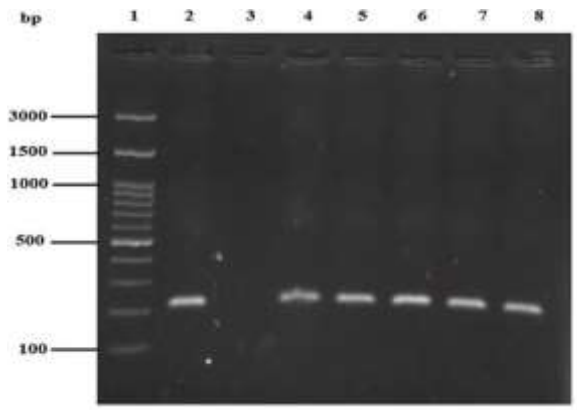
الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی بر آمده از آزمایش آنتی بیوگرام در کل از چهار جدایهٔ جدا شده از نمونه شیر ورم پستانی گوسفند، از نظر فنوتیپی، همگی به تتراسایکلین نیمه حساس و به اکسی تتراسایکلین مقاوم بودند. از ۸ جدایهٔ جدا شده از نمونه شیر بز، همگی به تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین حساس بودند.

نتایج مطالعات مولکولی (PCR)

نتایج مطالعات مولکولی منجر به شناسایی ۲۲ جدایه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از بین ۲۲ نمونهٔ 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* بر آمده از تکثیر ژن 16SrRNA (۲۰۷ جفت باز) بود



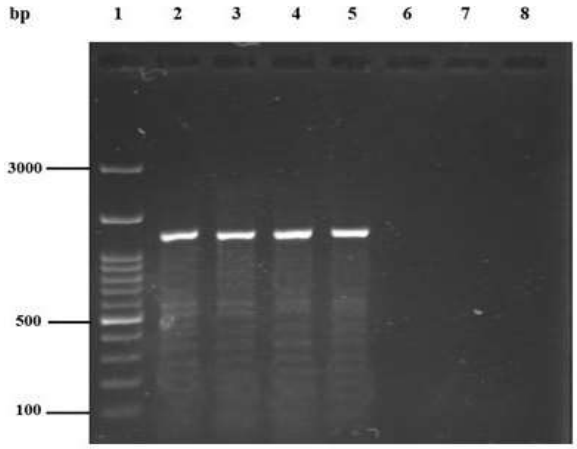
تصویر ۱: الکتروفورز مربوط به ژن *16SrRNA استرپتوکوکوس آگالاکتیه* نمونه‌های بز،چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰bp، چاهک‌های۲: کنترل مثبت، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸: نمونه‌های مثبت



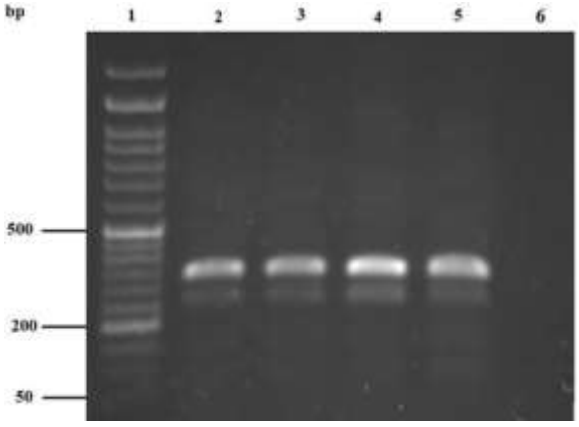
تصویر ۲: الکتروفورز مربوط به ژن *16SrRNA استرپتوکوکوس آگالاکتیه* نمونه‌های گوسفند.چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰bp، چاهک‌های۲: کنترل مثبت، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ : نمونه‌های مثبت

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

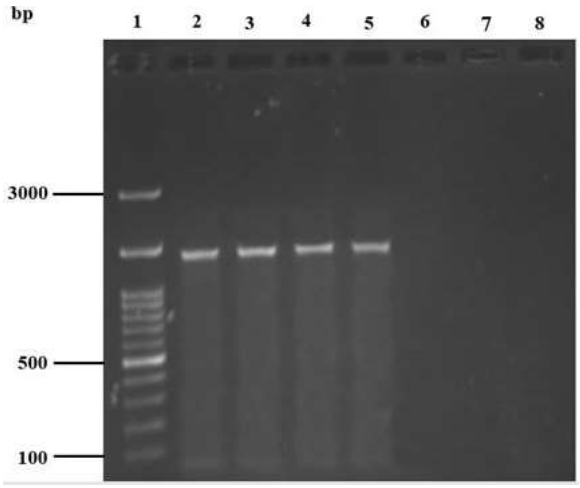
به منظور تأیید نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی به اکسی تتراسایکلین از پرایمرهای ژن‌های (tetO، tetL و tetM) استفاده شد. نتایج نشان داد چهار نمونهٔ مثبت شیر گوسفند از نظر وجود ژن‌های آورده مثبت اند. همچنین از تعداد ۷ نمونه مثبت شیر بز فقط دو نمونه مقاومت براساس ژن *tetM* را نشان داد. نتایج ژل الکترفورز در شکل‌های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



تصویر ۳: محصول PCR ژن *tet-O* چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۱۰۰bp، چاهک‌های۲: 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 ۱۰۰bp، چاهک‌های۲: کنترل مثبت، چاهک ۳، ۴ و ۵: نمونه‌های مثبت، چاهک ۸: نمونه کنترل منفی، چاهک‌های ۶، ۷: نمونه‌های منفی



تصویر ۵: محصول PCR ژن *tet-M*. چاهک‌های ۱: مارکر با وزن مولکولی ۵۰bp (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 اقتصادیِ ناشی از آن چشمگیرند و سهم قابل توجهی از هزینه‌های درمانی گاوداری‌ها را به خود اختصاص می‌دهند. متداول ترین 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 حائزِ 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 دهندهٔ 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 نمونهٔ بز آلوده به *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* بودند.

در دههٔ گذشته، تعدادی گزارش دربارهٔ حساسیت ضد میکروبی در عوامل ایجاد کنندهٔ 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 جدایه های 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 *tetO* و *tetM* به عنوان شایع ترین جدایه‌های 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 اریترومایسین نشان دهندهٔ محدودیت استفادهٔ 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 ضدِ میکروبی در سویه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* ظاهر نشده است.

در پژوهشِ راتو و همکاران (۲۰۱۳)، مقاومت به سفازولین و سفوپرازون تأیید شد (۲۷). همچنین در پژوهشِ Lindeman و همکاران (۲۰۱۳)، میزان گسترده‌ای از حساسیت به سفتیوفور و سفالوتین در بین جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از گاوهای شیری منطقهٔ آمریکای شمالی تشخیص داده شد[۲۸]. میزان حساسیت زیادِ پنی‌سیلین در مطالعات قبلی در جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در گاوهای مبتلا به ورم پستان تأیید شده است. در پژوهشِ راتو و همکاران، بیشترِ جدایه‌ها (۹۶/۶ درصد) به پنی‌سیلین حساس بودند، که نشان می‌دهد این آنتی بیوتیک گزینهٔ مناسبی برای درمان ورم پستان است. در انسان پنی‌سیلین به عنوان خطِ 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 (۱۹–۲۷).

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 پژوهشِ دیگری که Duarte و همکارانش (۲۰۰۴)، انجام دادند ۸۵ درصد ایزوله‌های جداشده 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.

در پژوهش‌های معتددی ژن‌های *tet* رایج ترین ژن‌های شناسایی شده در بین جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در گاو و انسان بوده‌اند (۱۷،۳۲، ۳۳). اما دیگر عوامل مانند *tetS* و *tetK* کمتر مشاهده شده‌اند[۲۷, ۳۱]. در پژوهش راتو و همکاران، چهار جدایه مقاومت فنوتیپی به تتراسایکلین نشان داده‌اند، هیچ کدام از ژن‌های *tetM* و *tetO* را نشان ندادند که می‌تواند نشان دهندهٔ وجود دیگر ژن‌های *tet*، مانند *tetS* و *tetK* باشد (۲۷). حمل و نقل *tetO* و *tetM*، فرضیه‌ای است که قبلاً به دست Duarte و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده است، در این مطالعه چهار جدایه دارای این ژن‌ها بودند (۳۱). در این مطالعه ۸ جدایه حساس به تتراسایکلین، حامل یک یا هر دوی این ژن‌ها بودند. دلایلی که ژن‌های مقاومت همیشه بیان نمی‌شوند، این است که نیاز به ارزیابی بیشتر دارند. دلایل احتمالی، می‌تواند شامل فقدان پروموتور roo و وجود جهش در ژن‌های مورد بررسی باشد.

بر اهمیت بررسی ژنتیکی دخیل در مقاومت به تتراسایکلین، در گزارش های قبلی تأکید شده است؛ زیرا ژن‌های *tet* اغلب در عناصر ژنتیکی متحرک یافت می‌شوند که مقاومت به ماکرولیدها، لینکوزامیدها و کلرامفنیکل را نیز رمزگذاری می‌کنند (۳۴). شیوع کم ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین، می‌تواند به علت جهش در ناحیهٔ اتصال پرایمر باشد که می‌تواند منجر به نتیجهٔ منفی کاذب شود. همچنین، مقاومت به تتراسایکلین می‌تواند به علت ژن‌های مقاومت دیگری باشد که تاکنون در *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* جدا نشده‌اند.

پرلگ و همکاران در پژوهشی ثابت کردند که مقاومت به تتراسایکلین از والدین به نوزادن به صورت افقی و با باکتری‌های فلور انتقال می‌یابد. بنابراین مصرف شیرهای آلوده به *استرپتوکوکوس*‌های مقاوم به اکسی تتراسایکلین و تتراسایکلین می‌تواند از نظر بهداشت عمومی و انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مطرح باشد.

در پژوهش کرمی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در همدان میزان مقاومت سویه‌های انتروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* نسبت به تتراسایکلین ۵۸/۴ درصد گزارش شده است که نسبت به پژوهشِ حاضر شیوع سویه‌های مقاوم بیشتر است (۳۵). از طرفی بعضی از مقاومت‌ها به جای کسب ژن می‌تواند بر اساس جهش‌های ایجاد شده در بخش *16SrRNA* ایجاد شود که در نتیجهٔ 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 کاست‌های ژنی مقاوم در آن‌ها 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 می‌شود.

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 مهم‌ترین اجرام عامل ورم پستان در گوسفند و بز منطقهٔ تهران است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در این تحقیق مشاهده شد. با توجه به حضور ژن‌های مورد مطالعه و در صورت فراهم شدن شرایط بیان ژن، مقاومت فنوتیپی در درصد بالایی از جدایه‌ها قابل پیش بینی است. بنابراین استفادهٔ صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها و غربالگری سریع و پیوستهٔ این میکروارگانیسم جهت جلوگیری از ظهور و گسترش *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*‌های مقاوم باید بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

تضاد منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچگونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

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 Streptococcusagalactiae 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 :(۶)۱۱ .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.

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 Streptococcusagalactiae.* 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 Detectionof Streptococcus agalactiae in Milk.* Journal of Dairy Science, 2002. 85(7): p. 1717-1723.

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 conferringcombined resistance to tetracycline and minocycline among group B streptococcal isolates from humans and various animals.* Zentralblatt für Bakteriologie, 1994. 281(4): p. 526-533.

27. Guérin-Faublée, 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.* Veterinarymicrobiology, 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 :(۵)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 sources.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. 49 :(۱)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.