دوره ۲۲، شماره ۶۹، بهار ۱۳۹۸، صفحات: ۱۴-۱

مقاله پژوهشی

تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه جداشده از اورام پستان گاو در گاوداری‌های شهرستان شهرکرد

سپیده کریمی[۱]، حسن ممتاز[۲]*

[۱] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۱۲/۲۶

چکیده

مقدمه: ورم پستان گاو یکی از بیماری های شایع در گله گاوهای شیری است که توسط عوامل مختلفی از جمله *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella Pneumonia*) ایجاد می‌شود. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف ردیابی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* در موارد اورام پستان بالینی و تحت بالینی در گاو و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۱۳۰ نمونه شیر از گاوهای شیری مبتلا به اورام پستان از گاوداری‌های شهرستان شهرکرد جمع‌آوری شدند و پس از کشت میکروبی و تأیید مولکولی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جدا گشته، حضور شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این جدایه‌ها به روش PCR (Polymerase Chain Reaction) و الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک ارزیابی شدند. جهت تجزیه و تحلیل نتایج از مدل‌های آماری مربع کای و دقیق فیشر در سطح اطمینان ۹۵ درصد در نرم‌افزار آماری SPSS 20 استفاده گردید.

یافته‌ها: از ۱۳۰ نمونه شیر مورد آزمایش، ۲۰ نمونه (۱۵/۳۸ درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند که در این جدایه‌ها حضور اکثر ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی ردیابی گردید؛ به‌طوری که ژن‌های *sulI* و *aadA1* به‌ترتیب با فراوانی ۷۰ و ۶۵ درصد شایع‌ترین و ژن‌های *cat1* و *cmlA* با فراوانی ۲۵ درصد نادرترین ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی ردیابی‌شده در این جدایه‌ها بودند. شایان ذکر است که تمام جدایه‌ها نسبت به پنی‌سیلین و تتراسیکلین مقاوم بودند.

نتیجه‌گیری: مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نشان‌دهنده استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک در درمان بیماری‌های عفونی بوده و لزوم انجام آنتی‌بیوگرام جهت انتخاب مؤثرترین آنتی‌بیوتیک در درمان اورام پستان را بیش از پیش بااهمیت می‌کند.

کلمات کلیدی: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شهرستان شهرکرد، *کلبسیلا پنومونیه*، ورم پستان گاو

* **نویسنده مسئول:** حسن ممتاز، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴؛ ایمیل: hamomtaz@yahoo.com، hamomtaz@iaushk.ac.ir

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه (*Klebsiella Pneumonia*) باکتری گرم منفی میله‌ای شکل غیرمتحرک و دارای کپسول پلی ساکاریدی است که این کپسول تمام سطح سلول را می پوشاند و علیه بسیاری از مکانسیم‌های دفاعی میزبان، مقاومت ایجاد می‌کند. اعضای جنس *کلبسیلا* دو نوع آنتی ژن لیپوپلی‌ساکارید (آنتی‌ژن O) و پلی‌ساکارید کپسولی آنتی‌ژن (K) را در سلول‌های خود بیان می‌کند (۱). فاکتورهای حدت مهمی در بیماری‌زایی باکتری نقش دارند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها کپسول پلی‌ساکاریدی (CPS: capsular polysaccharide synthesis) می‌باشد. واحدهای تکراری این کپسول پلی‌ساکاریدی از ۴ تا ۶ قند و در اکثر موارد از اسید اورونیک تشکیل شده است (۲). بیشتر سویه های *کلبسیلا پنومونیه* دارای مارکر k هستند و مارکرهای k_1، k_2، k_{54} و k_{57} اهمیت بیشتری در ایجاد مقاومت به فاگوسیت و ایجاد آبسه‌های کبدی در مقایسه با سایر جدایه ها دارند (۳). مجموعه ژن‌های CPS در تولید واحدهای پلی ساکاریدی کپسول، تجمع و اتصال آن‌ها به یکدیگر و تولید کپسول نقش دارند. کپسول باعث مقاومت باکتری به فاگوسیتوز و ایجاد ویرولانس قوی می‌شود. سوش‌های تهاجمی *کلبسیلا پنومونیه* با ایجاد کلنی‌های همراه با چسبندگی زیاد در پلیت آشکار می‌گردند (۴).

ورم پستان به التهاب غده پستانی بدون توجه به علت آن اطلاق می‌شود که به وسیله تغییرات فیزیکی، شیمیایی و معمولاً میکروبی شیر و همچنین تغییرات حاصل از بیماری در بافت غده پستانی مشخص می‌شود (۵). مهم ترین تغییراتی که در شیر ایجاد می‌شوند عبارت هستند از: تغییر رنگ، وجود لخته و پیدایش تعداد زیادی لوکوسیت با علائم تورم، گرمی، درد و سفت‌شدن غده پستانی که به وسیله آزمایش ظاهری شیر می‌توان آن‌ها را تشخیص داد. عفونت پستان در گاو و کاهش مقاومت این حیوان نسبت به عوامل بیماری‌زا منجر به بروز فرم حاد بالینی ورم پستان شده است و این عارضه به‌عنوان یکی از مسائل مهم در پرورش گاو به شمار می‌رود. در بسیاری از کشورها از جمله ایران، تورم پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در بین گاوهای شیری است (۶). *کلبسیلا پنومونیه* بعد از *اشریشیاکلی* به‌عنوان شایع‌ترین عامل ورم پستان محیطی گاو محسوب می‌شود که امروزه به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در فارم‌های پرورش دام و طیور، نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده است.

برخی از ارگانیسم‌ها به‌طور ذاتی به تعداد یا تمامی عوامل ضد میکروبی مقاوم هستند و برخی از آن‌ها با مکانیسم‌های موتاسیون و انتشار ژن‌های مقاومت از ارگانیسم‌های مقاوم به سایر ارگانیسم‌ها مقاوم می‌شوند (۷). انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق پلاسمیدها، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها صورت می‌گیرد (۸).

عامل اصلی بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه*، حضور برخی از ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله ژن‌های کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (*SHV*، *TEM* و *CITM*)، سولفانامیدها (*sul1*، *sul2* و *int1*)، جنتامایسین (*aac(3)-IV*)، سفالوتین (*blaSHV*)، استرپتومایسین (*strA*، *strB* و *aadA1*)، تتراسایکلین (*tetA-tetE* و *tetG*)، تری‌متوپریم (*dfrA1*، *dfrA13*، *dfr7* و *dfr17*)، فلوروکوئینولون (*qnr*) و کلرامفنیکل (*catI-catIII* و *cmlA*) می‌باشد (۹).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* در مطالعات مختلف مورد توجه قرار گرفته است؛ به‌عنوان مثال در مطالعه Das و همکاران (۲۰۱۷)، از ۵۰ ایزوله باکتری گرم منفی جداشده از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی، ۴۸ درصد مقاوم به تتراسیکلین بودند که در این بین، ۱۸ ایزوله واجد ژن bla_{CTX-M} و ۱۶ ایزوله حامل ژن

bla_{TEM} شناسایی شدند (۱۰). از سوی دیگر در مطالعه Podder و همکاران (۲۰۱۴)، ۶۱ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* از شیر اخذشده از گاوهای مبتلا به ورم پستان در ۱۱ فارم گاو شیری در نیوفوندلند جدا گردید که بر مبنای نتایج، تمام ایزوله‌ها نسبت به تتراسیکلین و استرپتومایسین مقاوم بودند (۱۱).

با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *کلبسیلا پنومونیه* و مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در صنعت دامپروری کشور، مطالعه حاضر با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از اورام پستان گاو انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه که به‌صورت توصیفی- مقطعی در طول شش ماه اول سال ۱۳۹۷ در ارتباط با گاوهای مبتلا به اورام پستان در گاوداری‌های شهرستان شهرکرد انجام شد، ۱۳۰ نمونه شیر از گاوهای مبتلا به اورام پستان بالینی و تحت بالینی که دارای نتیجه + تا +++ در آزمایش CMT (California Mastitis Test) بودند، اخذ گردید. در این آزمایش از محلول شیر آزما جهت تعیین درجه ابتلا به ورم پستان استفاده شد که براساس تعداد لوکوسیت‌های موجود در شیر، قوام لخته شیر اندازه‌گیری می‌گردد.

نمونه‌های شیر در حجم ۲۰ میلی‌لیتر در ظروف استریل و از دوشش‌های میانی پستان اخذ گردیدند و در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شدند. شایان ذکر است که همراه هر نمونه، پرسشنامه‌ای مبتنی بر اطلاعاتی نظیر سن گاو، تعداد زایمان، زمان ابتلا به ورم پستان، شدت ورم پستان و سابقه قبلی مصرف آنتی‌بیوتیک تهیه گردید.

کشت و جداسازی باکتری کلبسیلا پنومونیه

نمونه‌های شیر ابتدا در محیط غنی‌کننده TSB (Tryptic Soy Broth) (Merk، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس، به‌صورت خطی در محیط جامد EMB (Eosin Methylene Blue) (Merk، آلمان) کشت گردیدند.

در ادامه، پرگنه‌های موکوئیدی لاکتوز مثبت انتخاب شدند و پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده باسیل‌های گرم منفی در آن‌ها در محیط TSI (Triple Sugar Iron) و اوره کشت داده شدند و آزمایش IMViC (Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, and Citrate) در مورد آن‌ها انجام شد. پرگنه‌هایی که دارای واکنش ++-- در آزمون IMViC (شامل آزمون های: اندول، متیل رد، وژس پروسکوئر و سیترات)، واکنش اسید/ اسید در محیط TSI و اوره آز منفی بودند به‌عنوان پرگنه‌های *کلبسیلا پنومونیه* انتخاب شدند (۱۲).

جدایه‌های جداشده به‌منظور مطالعات بعدی در محیط TSB کشت و نگهداری گردیدند.

آزمایشات مولکولی

DNA ژنومی جدایه‌های مورد مطالعه با استفاده از کیت استخراج DNA (ساخت شرکت سیناژن ایران) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و پس از استخراج DNA، هر نمونه تا انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت تأیید قطعی وجود *کلبسیلا پنومونیه* در جدایه‌های مورد مطالعه، آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای *5-ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT-3* و *5-TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC-3* (سیناژن، ایران) جهت ردیابی ژن *16S-23S ITS* انجام شد. برنامه حرارتی مورد استفاده در این مرحله شامل: یک سیکل با

دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه؛ ۳۰ سیکل تکراری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه؛ سیکل انتهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه بود. وجود قطعه ۱۳۰ جفت بازی تکثیریافته در این واکنش نشان‌دهنده وجود *کلبسیلا پنومونیه* در جدایه‌های مورد مطالعه بود. در این آزمایش از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* *ATCC 700603* به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۳). به‌منظور ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل: ژن‌های *aadA1*، *aac(3)-IV*، *sul1*، *blaSHV*، *cat1*، *cmlA*، *tetA*، *tetB*، *dfrA1*، *blaCITM* و *qnr* از زوج پرایمرهای نشان‌داده‌شده در جدول ۱ با شرایط PCR ذکرشده در جدول ۲ در قالب PCR چندگانه (Multiplex PCR) انجام شد. سپس، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد محلول رنگی DNA safe stain (سیناژن، ایران) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت حدوداً یک ساعت صورت گرفت. ژل مورد نظر با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور UV بررسی گردید.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

به‌منظور تعیین الگوی فنوتیپی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از روش انتشار دیسک (آنتی‌بیوگرام) مطابق با معیار CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) (۲۰۱۷) استفاده شد (۱۸). جدایه‌های مورد مطالعه به مدت ۲۴ـ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مایع TSB کشت داده شدند.

پس از رشد باکتری، کدورتی معادل استاندارد نیم مک‌فارلند ($1/5\times10^8$ CFU/ml باکتری) از هر جدایه در محیط TSB تهیه گردید و با استفاده از سواپ استریل به‌صورت کاملاً متراکم روی محیط جامد مولر هینتون آگار (Himedia، India) کشت داده شد.

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی (پادتن طب، ایران) شامل:

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد ورم پستان گاو

مقاومت آنتی‌بیوتیکی	نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)	منبع
استرپتومایسین	*aadA1*	*(F) TATCCAGCTAAGCGCGAACT* *(R) ATTTGCCGACTACCTTGGTC*	۴۴۷	۱۴
جنتامایسین	*aac(3)-IV*	*(F) CTTCAGGATGGCAAGTTGGT* *(R) TCATCTCGTTCTCCGCTCAT*	۲۸۶	۱۴
سولفانامید	*sul1*	*(F) TTCGGCATTCTGAATCTCAC* *(R) ATGATCTAACCCTCGGTCTC*	۸۲۲	۱۴
سفالوتین	*blaSHV*	*(F) TCGCCTGTGTATTATCTCCC* *(R) CGCAGATAAATCACCACAATG*	۷۶۸	۱۴
کلرامفنیکل	*Cat1*	*(F) AGTTGCTCAATGTACCTATAACC* *(R) TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC*	۵۴۷	۱۴
کلرامفنیکل	*cmlA*	*(F) CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC* *(R) CACCTTGCCTGCCCATCATTAG*	۶۹۸	۱۴
تتراسیکلین	*tetA*	*(F) GGTTCACTCGAACGACGTCA* *(R) CTGTCCGACAAGTTGCATGA*	۵۷۷	۱۵
تتراسیکلین	*tetB*	*(F) CCTCAGCTTCTCAACGCGTG* *(R) GCACCTTGCTGATGACTCTT*	۶۳۴	۱۵
تری‌متوپریم	*dfrA1*	*(F) GGAGTGCCAAAGGTGAACAGC* *(R) GAGGCGAAGTCTTGGGTAAAAAC*	۳۶۷	۱۶
آمپی‌سیلین	*CITM*	*(F) TGGCCAGAACTGACAGGCAAA* *(R) TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC*	۴۶۲	۱۴
فلورکوئینولون	*qnr*	*(F) GGGTATGGATATTATTGATAAAG* *(R) CTAATCCGGCAGCACTATTTA*	۶۷۰	۱۷

جدول ۲: شرایط PCR چندگانه مورد استفاده جهت ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد ورم پستان گاو

ژن	برنامه PCR	حجم PCR (۵۰ میکرولیتر)
aadA1, aac(3)-IV, sul1, blaSHV, cat1, cmlA	۱ چرخه ۹۴ درجه ..... ۸ دقیقه ۳۲ چرخه ۹۵ درجه ..... ۶۰ ثانیه ۵۵ درجه ..... ۷۰ ثانیه ۷۲ درجه ..... ۲ دقیقه ۱ چرخه ۷۲ درجه ..... ۸ دقیقه	PCR buffer 10X= ۵ میکرولیتر Mgcl2= ۲/۵ میلی مول dNTP (Fermentas) = ۲۰۰ میکرو مول primers F & R= ۵/ میلی مول Taq DNA polymerase (Fermentas) = ۲ واحد DNA template= ۳ میکرولیتر
tetA, tetB, dfrA1, blaCITM	۱ چرخه ۹۴ درجه ..... ۸ دقیقه ۳۲ چرخه ۹۵ درجه ..... ۶۰ ثانیه ۵۵ درجه ..... ۷۰ ثانیه ۷۲ درجه ..... ۲ دقیقه ۱ چرخه ۷۲ درجه ..... ۸ دقیقه	PCR buffer 10X= ۵ میکرولیتر Mgcl2= ۲/۵ میلی مول dNTP (Fermentas) = ۲۰۰ میکرو مول primers F & R= ۵/ میلی مول Taq DNA polymerase (Fermentas) = ۲ واحد DNA template= ۳ میکرولیتر
qnr	۱ چرخه ۹۴ درجه ..... ۶ دقیقه ۳۲ چرخه ۹۵ درجه ..... ۶۰ ثانیه ۵۵ درجه ..... ۷۰ ثانیه ۷۲ درجه ..... ۷۰ ثانیه ۱ چرخه ۷۲ درجه ..... ۵ دقیقه	PCR buffer 10X= ۵ میکرولیتر Mgcl2= ۲/۵ میلی مول dNTP (Fermentas) = ۲۰۰ میکرو مول primers F & R= ۵/ میلی مول Taq DNA polymerase (Fermentas) = ۲ واحد DNA template= ۳ میکرولیتر

تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم/ دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم/ دیسک)، استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم/ دیسک)، کوتریموکسازول (۵ میکروگرم/ دیسک)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم/ دیسک)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم/ دیسک)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم/ دیسک)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم/ دیسک)، تری‌متوپریم (۵ میکروگرم/ دیسک)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم/ دیسک)، آمپی‌سیلین (۱۰ واحد/ دیسک)، پنی‌سیلین (۱۰ واحد/ دیسک) و اریترومایسین (۱۵ میکروگرم/ دیسک) با فاصله روی محیط گذاشته شدند و به مدت ۲۴ـ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی انکوبه گردیدند. پس از طی زمان رشد با اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد مطابق با معیار CLSI، حساسیت یا مقاومت باکتری نسبت به هر آنتی‌بیوتیک تعیین گردید (۱۶). در این آزمایش از سویه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603* (تهیه‌شده از کلکسیون میکروبی بیمارستان بقیه‌الله) به‌عنوان کنترل کیفی انجام آزمایش استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

جهت تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از نتایج و تعیین ارتباط بین فراوانی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان با متغیرهای مورد مطالعه و

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر جدایه از نرم‌افزار آماری SPSS 20 و مدل آماری مربع کای و دقیق فیشر استفاده گردید. در این آنالیز (P<۰/۰۵) به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

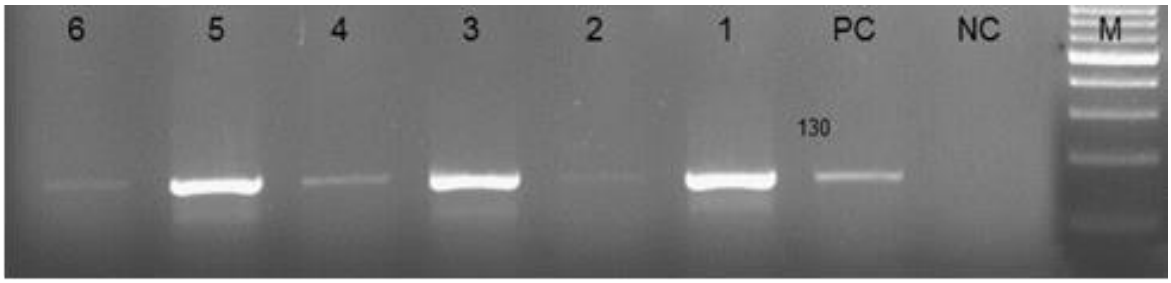
از ۱۳۰ نمونه شیر اخذشده از گاوهای مبتلا به ورم پستان، تعداد ۲۰ رأس (۱۵/۳۸ درصد) در کشت میکروبی آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند. شایان ذکر است که تمام ۲۰ جدایه جداشده در محیط کشت، در آزمایش PCR با ردیابی ژن *16s-23sITS* تأیید گردیدند. ژل حاصل از ردیابی قطعه ۱۳۰ جفت بازی مربوط به این ژن در شکل ۱ نشان داده شده است:

گاوهای مورد مطالعه در چهار گروه سنی از دو سال تا بالای پنج سال گروه‌بندی شدند. فراوانی آلودگی به *کلبسیلا پنومونیه* در هر گروه در جدول ۳ ارائه شده است:

همان‌گونه که در جدول ۳ مشهود است به موازات افزایش سن، آلودگی به *کلبسیلا پنومونیه* افزایش یافته و در تجزیه و تحلیل آماری نتایج، اختلاف آماری معناداری بین آلودگی گاوها با سن دو تا سه سال با سایر گروهای سنی (P=۰/۰۳۶) وجود دارد.

بر حسب تعداد زایمان قبلی، گاوهای مورد مطالعه به چهار گروه دو تا پنج شکم زاییده تقسیم شدند. همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، گاوهایی با دو شکم زایمان قبلی دارای ۹/۰۹ درصد آلودگی و گاوهای پنج شکم زاییده دارای ۲۰/۴۰ درصد آلودگی به *کلبسیلا پنومونیه* بودند.

آنالیز داده‌های حاصل از جدول ۴ نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنادار بین آلودگی گاوهایی با پنج زایمان قبلی با سایر گروه‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=۰/۰۴۱) بود.



شکل ۱: ژل حاصل از الکتروفوز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *16s-23sITS* در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از اورام پستان گاو (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون NC= نمونه کنترل منفی؛ ستون PC= نمونه کنترل مثبت؛ ستون های ۶-۱= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۳۰ جفت بازی)

جدول ۳: فراوانی اورام پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در گاوداری‌های شهرستان شهرکرد بر حسب سن گاو

گروه سنی (سال)	تعداد نمونه	تعداد و درصد موارد مثبت
۳-۲	۱۲	۱ (۸/۳۳)
۴-۳	۲۶	۳ (۱۴/۲۸)
۵-۴	۳۸	۵ (۱۵/۱۳)
بالای ۵	۵۴	۱۱ (۲۰/۳۷)
جمع کل	۱۳۰	۲۰ (۱۵/۳۸)

جدول ۴: فراوانی ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری بر حسب تعداد زایمان قبلی گاو

تعداد زایمان	تعداد نمونه	تعداد و درصد موارد مثبت
۲	۱۱	۱ (۹/۰۹)
۳	۲۹	۳ (۱۰/۳۴)
۴	۴۱	۶ (۱۴/۶۳)
۵	۴۹	۱۰ (۲۰/۴۰)
جمع کل	۱۳۰	۲۰ (۱۵/۳۸)

از نظر شدت ابتلا به ورم پستان (بر حسب نتایج آزمایش CMT)، تعداد ۲۶ رأس گاو دارای نتیجه +، ۴۷ رأس گاو دارای ورم پستان درجه ++ و ۵۷ رأس گاو دارای نتیجه +++ در آزمایش CMT بودند. فراوانی آلودگی به *کلبسیلا پنومونیه* در سه گروه در جدول ۵ نشان داده شده است.

تجزیه و تحلیل آماری، اختلاف آماری معناداری را بین فراوانی اورام پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* با درجه ابتلا + با دو گروه دیگر در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=۰/۰۳۵) نشان داد.

از ۱۳۰ رأس گاو مورد مطالعه، ۵۷ رأس گاو در ابتدای دوره شیرداری، ۴۶ رأس گاو در یک ماه قبل از خشکی پستان و ۲۷ رأس گاو در طول دوره خشکی پستان مبتلا به ورم پستان شده بودند. فراوانی آلودگی هر گروه به *کلبسیلا پنومونیه* در جدول ۶ آورده شده است:

مطابق با اطلاعات جدول ۶، *کلبسیلا پنومونیه* بیشتر در اوایل دوره شیرواری در دو هفته اول بعد از زایمان، ورم پستان ایجاد می کند. بر مبنای نتایج تجزیه و تحلیل آماری، اختلاف آماری معناداری بین فراوانی اورام پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در دو هفته اول بعد از زایمان با دوره خشکی و یک ماه قبل از خشکی پستان در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=۰/۰۲۹) وجود دارد.

بر حسب سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک در درمان ورم پستان اخیر در گاوهای مبتلا به ورم پستان از ۱۳۰ رأس گاو مورد مطالعه، ۷۳ رأس گاو سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک داشتند و ۵۷ رأس گاو با آنتی‌بیوتیک درمان نشده بودند. همان‌گونه که در جدول ۷ نشان داده شده است، ۸/۲۱ درصد از گاوهایی که درمان آنتی‌بیوتیکی شده بودند و ۲۴/۵۶ درصد از گاوهایی که در دوره اخیر ورم پستان با آنتی‌بیوتیک درمان نشده بودند، آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند.

آنالیز آماری داده‌های حاصل از جدول ۷ نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معناداری بین فراوانی آلودگی پستان به *کلبسیلا پنومونیه* با سابقه قبلی درمان آنتی‌بیوتیکی در گاوهای مورد مطالعه بود (P=۰/۰۲۳).

در این پژوهش الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه های *کلبسیلا پنومونیه* به دو روش مولکولی و

جدول ۵: فراوانی ورم پستان ناشی از کلبسیلا پنومونیه در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری بر حسب نتایج آزمایش CMT

شدت ابتلا نتیجه (CMT)	تعداد نمونه	تعداد درصد موارد مثبت
+	۲۶	۱۰ (۴۶/۳۸)
++	۴۷	۶ (۱۲/۷۶)
+++	۵۷	۴ (۷/۰۱)
جمع کل	۱۳۰	۲۰ (۱۵/۳۸)

جدول ۶: فراوانی ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در گاوداری‌های شهرستان شهرکرد بر حسب زمان ابتلا به ورم پستان

زمان ابتلا	تعداد نمونه	تعداد درصد موارد مثبت
دو هفته اول بعد از زایمان	۵۷	(۲۲/۸۰)
یک ماه قبل از خشکی پستان	۴۶	۶ (۱۳/۰۴)
۴۵-۳۰ روز قبل از زایمان	۲۷	۱ (۳/۷۰)
جمع کل	۱۳۰	۲۰ (۱۵/۳۸)

آنتی‌بیوگرام ارزیابی گردید که در قسمت مولکولی، حضور ۱۰ ژن کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک به روش PCR در جدایه‌ها ردیابی شد. نتایج در جدول ۸ نشان داده شده است.

همان‌گونه که در جدول ۸ مشهود است، ژن‌های *sul1* (۷۰ درصد) و *aadA1* (۶۵ درصد) شایع‌ترین و دو ژن *cal1* و *cmlA* (۲۵ درصد) نادرترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های مورد مطالعه بودند.

در آنالیز آماری نتایج حاصل از ردیابی ژن‌های فوق، بین حضور ژن‌های *cat1*، *cmlA*، *blaSHV* و *dfrA1* با سایر ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی اختلاف آماری معناداری (P=۰/۰۳۳) مشاهده گردید.

در ارزیابی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی از روش انتشار دیسکی ساده مطابق با معیار CLSI استفاده شد و حساسیت یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۲۰ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* به ۱۳ آنتی‌بیوتیک رایج در درمان بیماری‌های عفونی دام تعیین گردید. نتایج در جدول ۹ قابل مشاهده می باشد.

بر مبنای اطلاعات جدول ۹، علاوه بر مقاومت ۱۰۰ درصدی جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین و پنی‌سیلین، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول (۷۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به سیپروفلوکساسین (۱۵ درصد) و نیتروفورانتوئین (۲۰ درصد) مشاهده گردید. در تجزیه و تحلیل آماری نتایج فوق، اختلاف آماری معناداری بین مقاومت به چهار آنتی بیوتیک تتراسایکلین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و کوتریموکسازول با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها (P=۰/۰۴۱) وجود داشت.

جدول ۷: فراوانی ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* در گاوداری‌های استان چهارمحال و بختیاری بر حسب سابقه قبلی مصرف آنتی‌بیوتیک

سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک	تعداد نمونه	تعداد درصد موارد مثبت
دارند	۷۳	۶ (۸/۲۱)
ندارند	۵۷	۱۴ (۲۴/۵۶)
جمع کل	۱۳۰	۲۰ (۱۵/۳۸)

جدول ۸: توزیع ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از اورام پستان گاو

ژن	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	جمع کل
aadA1	+		+	+		+	+		+	+		+	+		+	+		+	+		۱۳
aac(3-IV)	+	+			+	+		+			+		+	+		+	+	+		+	۱۲
sul1	+		+	+		+	+		+	+		+	+	+		+	+		+	+	۱۴
blaSHV		+			+			+			+				+			+			۶
cat1		+				+						+					+			+	۵
cmlA				+					+						+			+	+		۵
tetA	+	+	+		+		+	+			+		+		+		+	+		+	۱۲
tetB				+		+		+	+	+	+	+	+	+		+			+	+	۱۲
dfrA1	+		+			+			+					+			+			+	۷
blaClTM	+		+	+		+	+		+	+		+	+			+			+		۱۱

جدول ۹: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورم پستان گاو

نام آنتی‌بیوتیک	تعداد و درصد ایزوله‌های مقاوم	نام آنتی‌بیوتیک	تعداد و درصد ایزوله‌های مقاوم
تتراسایکلین	۲۰ (۱۰۰)	**سفالوتین**	۷ (۳۵)
کلرامفنیکل	۸ (۴۰)	**سیپروفلوکساسین**	۳ (۱۵)
استرپتومایسین	۱۱ (۵۵)	**تری‌متوپریم**	۵ (۲۵)
کوتریموکسازول	۱۴ (۷۰)	**نیتروفورانتوئین**	۴ (۲۰)
جنتامایسین	۹ (۴۵)	**آمپی‌سیلین**	۷ (۳۵)
انروفلوکساسین	۶ (۳۰)	**پنی‌سیلین**	۲۰ (۱۰۰)
آزیترومایسین	۸ (۴۰)		

بحث

باکتری *کلبسیلا پنومونیه* به همراه *اشریشیاکلی* و *انتروباکتر آئروژنز* عامل ایجاد ورم پستان کلی فرمی در گاو هستند و در طول صد سال گذشته مطالعات وسیعی در مورد آن ها به‌ویژه *کلبسیلا پنومونیه* و *E.coli* انجام شده است. باید خاطرنشان ساخت که حضور همیشگی آن‌ها در فلور طبیعی روده باعث شده است که به‌عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب مطرح شوند. شایان ذکر است که آن‌ها با جایگزینی در بافت‌های مختلف از توان ایجاد بیماری‌های خطرناکی برخوردار می‌باشند (۵،۱۹).

ورم پستان کلی فرمی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی در صنعت پرورش گاو شیری است که همه ساله خسارات اقتصادی زیادی را به صنعت دامداری وارد کرده و علاوه بر هزینه دارو و درمان، حذف پیش از موعد گاوهای باارزش و کاهش شدید تولید شیر، ضررهای زیادی را به دامدار وارد می‌سازد (۵،۶).

مطالعه حاضر با هدف جداسازی *کلبسیلا پنومونیه* از موارد اورام پستان گاو در گاوداری‌های سطح شهرستان شهرکرد، بررسی ارتباط بین فراوانی آلودگی با متغیرهایی نظیر سن، شدت و زمان ابتلا به ورم پستان، سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های جداشده انجام شد.

در این پژوهش از ۱۳۰ رأس گاو مبتلا به ورم پستان که دارای واکنش + تا +++ در آزمایش CMT بودند، تعداد ۲۰ رأس دام (۱۵/۳۸ درصد) آلوده به ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* بودند.

محمدصادق و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه‌ای در مورد میزان بروز ورم پستان‌های کلی فرمی در گاوهای شیری در اطراف گرمسار، از ۱۴۴ مورد ورم پستان بالینی، ۵۱ نمونه (۳۴ درصد) را مبتلا به ورم پستان کلی فرمی تشخیص دادند که در این میان ۱۴/۸ درصد از گاوهای مبتلا، آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بودند (۲۰).

در مطالعه سالکی و مرادی در ارتباط با گاوداری‌های شهرستان ایلام نیز برای ۳۲ رأس گاو مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی، آزمایش میکروبیولوژی انجام شد که شیر ۲۶ رأس گاو (۸۱/۲۵ درصد) آلوده به *کلبسیلا پنومونیه* بود (۲۱).

از سوی دیگر، حسین‌خان ناظر و زاهدی (۱۳۷۵) در مطالعه‌ای که در مورد توان تولید آنزیم بتالاکتاماز در باکتری‌های جداشده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان در اطراف شیراز انجام دادند، از ۵۱۰ رأس گوسفند شیری که بیش از دو هفته از زایمان آن‌ها گذشته بود، نمونه‌گیری نمودند و با انجام آزمایش‌های میکروبیولوژی موفق به جداسازی ۱۶۲ جدایه باکتری شدند که ۳۲/۶ درصد از باکتری‌های جداشده متعلق به گونه *کلبسیلا*

پنومونیه بود (۲۲).

تفاوت در میزان فراوانی ورم پستان‌های کلی فرمی به ویژه با منشأ *کلبسیلا پنومونیه* در پژوهش حاضر با مطالعات مشابه انجام‌شده به تفاوت در شکل ورم پستان (بالینی یا تحت بالینی)، زمان اخذ نمونه (ابتدا یا انتهای دوره شیرواری)، شدت ورم پستان (واکنش CMT) و به‌ویژه تفاوت در شیوه مدیریتی و بهداشتی اعمال‌شده در گاوداری‌ها مربوط می‌باشد. امروزه با پیشرفت اصول بهداشتی، شیوع اورام پستان بالینی در گاوداری‌های کشور کاهش یافته است (۵،۶).

عمدتاً *کلبسیلا پنومونیه* عامل ورم پستان تحت بالینی می‌باشد. در پژوهش حاضر ۴۶/۳۸ درصد از گاوهای مبتلا به ورم پستان با درجه + در آزمایش CMT مبتلا به ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* بودند که در مطالعه محمدصادق و همکاران (۱۳۹۱) نیز این یافته اثبات شده است (۲۰).

به موازات افزایش سن به دلیل افزایش تعداد دفعات دوشش و افزایش شانس برخورد دام با عوامل عفونی، شیوع ورم پستان‌های کلی فرمی افزایش می‌یابد؛ به‌طوری که در مطالعه حاضر ۲۰/۳۷ درصد از گاوهای بالای پنج سال و ۲۰/۴۰ درصد از گاو هایی که پنج شکم زایمان کرده بودند، مبتلا به ورم پستان ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* بودند.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها یکی از مشکلات اصلی عدم موفقیت در درمان بیماری‌های عفونی از جمله ورم پستان گاو است. انتقال مقاومت دارویی بین باکتری‌ها از طرق مختلف نظیر ژن‌های پلاسمیدی، ترانسپوزون‌ها و اینتگرون‌ها انجام می‌شود و بروز مقاومت ناشی از فعال‌بودن ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری می‌باشد؛ این ژن‌ها روی کروموزوم یا پلاسمید قرار می‌گیرند.

کلبسیلا پنومونیه به‌عنوان یکی از عوامل مولد ورم پستان کلی فرمی و یکی از شایع‌ترین باکتری‌های مولد عفونت‌های بیمارستانی در انسان از این قاعده مستثنی نبوده و امروزه بیشتر سویه‌های باکتری نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بیماری‌های عفونی مقاوم هستند.

در این راستا، مطالعه حاضر با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام شد.

در پژوهش حاضر تمام ۲۰ جدایه جداشده از موارد ورم پستان گاو در گاوداری‌های شهرستان شهرکرد دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بودند که در این میان، تمام ۲۰ جدایه (۱۰۰ درصد) نسبت به پنی‌سیلین و تتراسایکلین مقاومت داشتند. پس از تتراسایکلین و پنی‌سیلین، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کوتریموکسازول (۷۰ درصد) و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به دو آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۱۵ درصد) و نیتروفورانتوئین (۲۰ درصد) وجود داشت.

در بررسی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی که با ردیابی شایع‌ترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد ورم پستان گاو به روش PCR انجام شد، تمام ۱۰ ژن مورد مطالعه در جدایه‌های مورد بررسی وجود داشتند که در این میان، دو ژن *tetA* و *tetB* (کدکننده مقاومت به تتراسایکلین) در تمام ۲۰ جدایه ردیابی شدند. ژن‌های *sul1* (کدکننده مقاومت نسبت به سولفونامیدها) و *aadA1* (کدکننده مقاومت نسبت به استرپتومایسین) با فراوانی ۷۰ و ۶۵ درصد از شایع‌ترین ژن‌های ردیابی‌شده و ژن‌های *cat1* و *cmlA* با فراوانی ۲۵ درصد از نادرترین ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های مورد مطالعه بودند.

در مطالعه محمدصادق و همکاران (۱۳۹۱) از ۵۱ نمونه شیر مبتلا به ورم پستان کلی فرمی، ۷۷/۷ درصد از جدایه‌ها نسبت به کوتریموکسازول، ۲۵/۹۲ درصد نسبت به

کلرامفنیکل، ۹/۲۵ درصد نسبت به استرپتومایسین، ۱۲/۹۶ درصد نسبت به انروفلوکساسین و ۴۰/۷۴ درصد نسبت به تتراسایکلین مقاوم بودند (۲۰).

در این راستا، در مطالعه استبرقی و همکاران (۱۳۹۷) الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۰ جدایه دامی و انسانی *کلبسیلا پنومونیه* جمع‌آوری‌شده از شهر بابک تبریز به روش انتشار دیسک ارزیابی گردید. نتایج نشان دادند که تمام سویه‌های تحت مطالعه (۱۰۰ درصد) نسبت به آمپی‌سیلین و آمیکاسین مقاوم هستند. بیشترین و کمترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز مربوط به تتراسایکلین (۸۸/۳ درصد) و ایمی‌پنم (۱۳/۳ درصد) بود (۲۳).

از سوی دیگر، در مطالعه ممتاز و همکاران (۲۰۱۲) که در مورد ۷۳ جدایه *اشریشیاکلی* جداشده از ۲۶۸ نمونه شیر مربوط به گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی و تحت بالینی انجام شد، ژن *aadA1* با فراوانی ۶۵/۹۵ درصد شایع‌ترین و ژن *blaSHV* (کدکننده مقاومت به سفالوسپورین‌ها) با شیوع ۶/۳۸ درصد نادرترین ژن کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این جدایه‌ها بود. در این مطالعه ۵۷/۴۴ درصد از جدایه‌های مورد مطالعه نسبت به تتراسایکلین و ۶/۳۸ درصد از آن‌ها نسبت به سفالوتین مقاوم بودند (۲۴).

علاوه‌براین در مطالعه Osman و همکاران (۲۰۱۴)، ۴۵ جدایه *کلبسیلا پنومونیه* از ۲۳۲ نمونه شیر بوفالو (۱۰ جدایه) و ۲۹۳ نمونه شیر گاو (۳۵ جدایه) جدا گردید که تمام جدایه‌های جداشده دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه بودند (۲۵).

در مطالعه توکلی و پورتقی (۲۰۱۷) که در ارتباط با فراوانی ورم پستان‌های کلی فرمی در گاوداری‌های استان البرز انجام شد، ۶۰ جدایه *E. coli* از ۸۶ کارتیه آلوده در هشت فارم صنعتی جدا گردید. تمام جدایه‌های جداشده نسبت به پنی‌سیلین، تایلوزین، تتراسایکلین، اریترومایسین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین و نئومایسین مقاوم بودند (۲۶).

شیوع بالای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر و مطالعات مشابه ذکرشده نشان‌دهنده استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان دام و طیور می‌باشد که بسته به نوع منطقه و نحوه تجویز آنتی‌بیوتیک، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوت خواهد بود.

یکی از موارد جالب مقاومت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر، شیوع بالای مقاومت به کلرامفنیکل (۴۰ درصد) در جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* جداشده از موارد اورام پستان در گاوداری‌های شهرستان شهرکرد بود. هرچند این آنتی‌بیوتیک ممنوعیت مصرف دارد؛ اما به دلیل استفاده غیرمجاز به‌ویژه در صنعت پرورش طیور در کشور، در بیشتر مطالعات و از جمله مطالعه حاضر شاهد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی نسبت به این آنتی‌بیوتیک هستیم.

نتیجه‌گیری

در مجموع، شیوع نسبتاً بالای ورم پستان‌های کلبسیلایی و مقاومت آنتی‌بیوتکی بالای جدایه‌های جداشده در مطالعه حاضر نشان‌دهنده مصرف غیرمجاز و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در درمان بیماری‌های عفونی در انسان و دام می‌باشد؛ از این رو توصیه می‌گردد که درمان بیماری‌های عفونی از جمله ورم پستان گاو، به‌طور کامل و براساس نتایج آنتی‌بیوگرام صورت گیرد و با رعایت اصول بهداشتی و مدیریتی در فارم‌های پرورش گاو شیری، شیوع ورم پستان‌های بالینی کاهش یابد و با معاینه صحیح و به‌موقع گاوها به‌ویژه در طول دوره خشکی، کارتیه‌های آلوده و مبتلا به ورم پستان تحت بالینی شناسایی گشته و درمان یا حذف شوند.

حمایت مالی

این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی بوده و با حمایت مالی حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه ها با هماهنگی اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری و با اطلاع دامدار از گاوهای مبتلا به ورم پستان تهیه شده اند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی بین نویسندگان وجود ندارد و مقاله با اطلاع و هماهنگی آن ها ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات همکاران اداره کل دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد؛ جناب آقای مهندس صفری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs medical microbiology. 26th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2012. P. 229-41.
2. García-Sureda L, Doménech-Sánchez A, Barbier M, Juan C, Gascó J, Albertí S. OmpK26, a novel porin associated to carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(10):4742-7.
3. Luo Y, Yang J, Zhang Y, Ye L, Wang L, Guo L. Prevalence of β-lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. Int J Antimicrob Agents. 2011; 37(4): 352-5.
4. Dubey D, Raza FS, Sawhney A, Pandey A. *Klebsiella pneumoniae* renal abscess syndrome: a rare case with metastatic involvement of lungs, eye, and brain. Case Rep Infect Dis. 2013; 2013:685346.
5. Vejgani M, Gharagozlo F. Control of mastitis in dairy herds. Tehran: Nikkhah Sepehr Publishing; 2001. P. 125-255. [in Persian]
6. Ohadinia H. Mastitis in cow. Tehran: Science and Technology Publication; 2007. P. 72-96. [in Persian]
7. Jalalpour SH, Kasra Kermanshahi R, Nouhi AS, Zarkesh Isfahani H. Comparing the frequency of β-lactamase enzyme in isolated nosocomial infectious bacteria. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2009; 8(3):32. [in Persian]
8. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol. 2007; 15(7):301-9.
9. Lapierre L, Cornejo J, Borie C, Toro C, San Martín B. Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine. Microb Drug Resist. 2008; 14(4):265-72.
10. Das A, Guha C, Biswas U, Jana PS, Chatterjee A, Samanta I. Detection of emerging antibiotic resistance in bacteria isolated from subclinical mastitis in cattle in West Bengal. Vet World. 2017; 10(5):517-20.
11. Podder MP, Rogers L, Daley PK, Keefe GP, Whitney HG, Tahlan K. *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. PLoS One. 2014; 9(9):e106518.
12. Tavakol M, Momtaz H. Determination of antibiotic resistance profile in *Klebsiella pneumonia* strains isolated from urinary tract infections of patients hospitalized in Peyambaran hospital (Tehran-Iran). Feyz. 2017; 21(1):74-82. [in Persian]
13. Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. Int J Food Microbiol. 2008; 125(3):230-5.
14. Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. Int J Food Microbiol. 2008; 124(3):217-23.
15. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. J Antimicrob Chemother. 2004; 53(2):208-16.
16. Toro CS, Farfán M, Contreras I, Flores O, Navarro N, Mora GC, et al. Genetic analysis of antibiotic-resistance determinants in multidrug-resistant *Shigella* strains isolated from Chilean children. Epidemiol Infect. 2005; 133(1):81-6.
17. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(1):71-6.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

19. Tiwari J, Babra C, Tiwari H, Williams V, De Wet S, Gibson J, et al. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. J Vaccine Vaccin. 2013; 4(1):1-11.
20. Mohammad SM, Askari Badouei M, Gorji DM, Daneshvar M, Koochakzadeh A. A study on the clinical coliform mastitis of holstein cows on Garmsar Suburban dairy farms. J Vet Microbiol. 2012; 8(2): 137-49. [in Persian]
21. Salaki K, Moradi H. Bacterial agents of mastitis in dairy cow farms in Ilam city. Sci J Ilam Univ Med Sci. 2012; 20(4):88-95. [in Persian]
22. Hosseinkhannazer A, Zahedi A. Investigating potentials for beta-lactamase production in bacteria isolated from sheep with mastitis. Pajouhesh Sazandegi. 1996; 30(75):116-21. [in Persian]
23. Estabraghi E, Zahraei ST, Amini K, Jamshidian M. Survey genotyping of animal and human *Klebsiella pneumoniae* isolates using ERIC-PCR and evaluation of antibiotic sensitivity pattern. J Comp Pathobiol Iran. 2018; 15(2):2469-77. [in Persian]
24. Momtaz H, Safarpoor Dehkordi F, Taktaz T, Rezvani A, Yarali S. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk: serogroups, virulence factors, and antibiotic resistance properties. Sci World J. 2012; 2012:618709.
25. Osman KM, Hassan HM, Orabi A, Abdelhafez AS. Phenotypic, antimicrobial susceptibility profile and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from buffalo and cow mastitic milk. Pathog Global Health. 2014; 108(4):191-9.
26. Tavakoli M, Pourtaghi H. Molecular detection of virulence genes and multi-drug resistance patterns in *Escherichia coli* (STEC) in clinical bovine mastitis: Alborz province, Iran. Iran J Vet Res. 2017; 18(3): 208-11.

Volume 22, Issue 69, Spring 2019, Pages: 1-14

Original Article

Determination of Antibiotic Resistance Pattern in *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Shahrekord, Iran

Sepideh Karimi[1], Hassan Momtaz[2*]

[1] MSc in Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 06 February 2019 **Accepted:** 17 March 2019

Abstract

Introduction: Bovine mastitis is one of the most common diseases in dairy cattle that is caused by various infectious agents, such as *Klebsiella pneumoniae*. The aim of this study was to detect *Klebsiella pneumoniae* in bovine clinical and subclinical mastitis and investigate the antibiotic resistance pattern of this bacterium.

Materials and Methods: A total of 130 milk samples were collected from diary cattle with mastitis in the dairy farms of Shahrekord, Iran. After microbial culture and molecular confirmation of *Klebsiella pneumoniae* strains, the presence of the most common genes encoding antibiotic resistance in these isolates was determined by polymerase chain reaction. In addition the phenotypic pattern of these isolates were investigated by the simple disk diffusion method. For statistical analysis, Chi-square and Fisher's exact tests were run in SPSS software (version 20) at 95% confidence level.

Results: Out of the 130 samples tested, 20 (15.38%) specimens were infected with *Klebsiella pneumoniae*. In these isolates, most of the genes encoding antibiotic resistance were detected. In this regard, the *sulI* and *aadA1* genes with the frequencies of 70% and 65% had the highest prevalence, and the *cat1* and *cm1A* genes with a frequency of 25% were identified as the rarest antibiotic resistance genes detected in these isolates. All isolates were resistant to penicillin and tetracycline.

Conclusion: Multiple antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains indicates the unnecessary use of antibiotics in the treatment of infectious diseases and the need for antibiograms to select the most effective antibiotic in the treatment of bovine mastitis.

Keywords: Antibiotic resistance pattern, Bovine mastitis, *Klebsiella pneumoniae*, Shahrekord Township

* ***Corresponding Author:*** Hassan Momtaz, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Tel: 03833361064; Email: hamomtaz@yahoo.com, hamomtaz@iaushk.ac.ir