مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۱۷

بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی در استان اصفهان

دکتر سید اصغر هوایی[۱]، دکتر بهرام نصر اصفهانی[۱]، نفیسه سادات حسینی[۲]، بهناز اسدبیگی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی ایجاد ورم پستان گاوی است. مقاومت برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص متی‌سیلین، درمان عفونت ناشی از آن را با مشکلات بسیاری مواجه کرده است. همچنین انتقال سویه‌های مقاوم به انسان نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. از این رو، هدف این مطالعه، بررسی میزان شیوع ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در گاوداری‌های استان اصفهان و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این ایزوله‌ها بود.

روش‌ها: تعداد ۴۵۰ نمونه‌ی شیر جمع‌آوری شد. پس از تلقیح و انجام آزمون‌های مربوط، مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های جداسازی شده، با روش انتشار دیسک بررسی گردید. آزمون D-test (Double disk diffusion test) جهت ردیابی مقاومت القایی کلیندامایسین (ICR یا Inducible clindamycin resistance) صورت گرفت. سپس سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA یا Methicillin-resistant staphylococcus aureus) با استفاده از دو روش اگزاسیلین آگار اسکرین و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن ردیابی شدند.

یافته‌ها: تعداد ۵۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی گردید. تمامی ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین حساس بودند. تعداد ۳۱، ۲۵، ۸، ۷ و ۲ ایزوله به ترتیب نسبت به اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین و کوتریموکسازول مقاوم بودند. D-test برای تمامی سویه‌ها منفی بود. ۹ سویه‌ی MRSA با استفاده از روش اگزاسیلین آگار اسکرین و ۱۰ سویه‌ی MRSA با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: از آن جا که انتظار می‌رود شیوع استافیلوکوکوس اورئوس، به خصوص سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گاوداری‌ها، بسیار ناچیز باشد، حتی درصد شیوع پایین گزارش شده نیز، مشکلات زیادی به دنبال خواهد داشت. بنابراین انجام یک آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی مناسب، قبل از شروع درمان آنتی‌بیوتیکی در موارد ورم پستان گاوی، حایز اهمیت است.

واژگان کلیدی: ورم پستان گاوی، استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، Methicillin-resistant staphylococcus aureus

ارجاع: هوایی سید اصغر، نصر اصفهانی بهرام، حسینی نفیسه سادات، اسدبیگی بهناز. **بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ردیابی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی در استان اصفهان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ۱۳۲۹-۱۳۱۹

۱- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- کارشناس ارشد،گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: بهناز اسدبیگی
Email: beh69766@yahoo.com

مقدمه

ماستیتیس یا ورم پستان، به التهاب غده‌ی پستانی اطلاق می‌شود. واژه‌ی ورم پستان از کلمه‌ی یونانی Mastos به معنی پستان و Itis به معنی التهاب تشکیل شده است. این التهاب می‌تواند بر اثر ضربه یا صدمه‌ی فیزیکی به پستان، تحریک‌های شیمیایی و عفونت ایجاد شده به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌ها ایجاد شود که مورد آخر از متداول‌ترین انواع ورم پستان به شمار می‌رود (۳-۱). ورم پستان گاوی به عنوان یکی از پر هزینه‌ترین بیماری‌های گاو شیری در سرتا سر جهان مطرح است و سبب کاهش کیفیت و کمیت شیر تولیدی، افزایش هزینه‌های درمانی و خدمات دامپزشکی، افزایش سقط جنین و کاهش باروری در گاو می‌شود و در موارد شدید، منجر به حذف دام مبتلا به بیماری خواهد شد (۵-۴).

ورم پستان را از نظر علایم بالینی می‌توان به دو دسته‌ی عمده‌ی تحت بالینی (Subclinical) و بالینی (Clinical) تقسیم کرد (۶، ۱). بر خلاف حالت بالینی که با تغییرات غیر طبیعی قابل مشاهده‌ای مانند تورم، قرمزی و گرمی در پستان و نیز حضور لخته، رگه و ترشحات غیر معمول داخل شیر همراه است، در ورم پستان تحت بالینی، شیر و پستان گاو، هر دو در ظاهر طبیعی به نظر می‌رسند؛ اما میزان لکوسیت‌های شیر (سلول‌های سوماتیک شیر) افزایش می‌یابد و عوامل پاتوژن در غده‌ی شیری حضور دارند. این نوع ورم پستان را می‌توان به وسیله‌ی آزمایش‌های مختلف، که برای پی بردن به حضور میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود، و یا به وسیله‌ی شمارش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر Scc (Somatic cells count) تشخیص داد (۸-۷، ۱).

میکروارگانیسم‌های عمده در بروز ورم پستان به دو دسته‌ی اصلی، واگیردار (Contagious) و محیطی (Environmental) تقسیم می‌شوند. عوامل واگیردار از پستان آلوده به پستان غیر آلوده و گاوهای سالم سرایت می‌کنند، منبع اصلی آن‌ها غده‌ی شیری آلوده است و سبب افزایش Scc به بیش از ۴۰۰۰۰۰ در میلی‌لیتر می‌شوند. یکی از شایع‌ترین عوامل واگیردار ورم پستان، استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (۱۰-۹، ۴). بیشتر عفونت‌های داخل پستانی که در اثر استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می‌شوند، تحت بالینی هستند و در نتیجه، درمان این بیماری به موقع انجام نمی‌شود. عدم تشخیص به موقع و تأخیر درمان در چنین مواردی، منجر به پیشرفت بیماری و ایجاد ماستیتیت چرکی (Suppurative) حاد، گانگرونوز و مزمن خواهد شد که اغلب موارد، مرگ و حذف دام آلوده را در پی دارد (۱۲-۱۱).

از طرف دیگر، مقاومت برخی سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس به آنتی‌بیوتیک‌ها به خصوص متی‌سیلین، درمان عفونت ناشی از آن را با مشکلات بسیاری مواجه می‌کند، سبب افزایش بروز بیماری، طول دوره و هزینه‌ی درمان می‌شود که اغلب منجر به مرگ دام مبتلا خواهد شد. علاوه بر خسارات اقتصادی، مسأله‌ی بهداشت عمومی و انتقال سویه‌های مقاوم به انسان نیز از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۳، ۹).

حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA یا Methicillin-resistant staphylococcus aureus) مرتبط با ورم پستان برای اولین بار طی سال‌های ۷۵-۱۹۷۲، در بلژیک گزارش شد (۱۵-۱۴). به

تازگی، یک کلون اختصاصی MRSA، CC۳۹۸ (Clonal complex۳۹۸)، که مرتبط با خوک‌ها، گوساله‌ها، جوجه‌ها، حیوانات خانگی و انسان‌های دارای تماس نزدیک با حیوانات است، مشاهده شده است. MRSA از این نوع را MRSA مرتبط با احشام یا LA-MRSA (Livestock-associated methicillin resistance Staphylococcus aureus) می‌گویند (۱۳). ظهور MRSA در گاوهای شیری ممکن است در اثر تماس با دیگر گونه‌ها، برای مثال CC۳۹۸ و یا در اثر تبادل مواد ژنتیکی بین استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی باشد که این استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی، یکی از رایج‌ترین گونه‌های مرتبط با عفونت داخل پستانی گاوی هستند و به طور معمول عوامل تعیین کننده‌ی مقاومت ضد میکروبی را حمل می‌کنند (۹).

بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در گاوداری‌های استان اصفهان، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت القایی کلیندامایسین (ICR یا Inducible clindamycin resistance) در این ایزوله‌ها و بررسی فراوانی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس (MRSA) عامل ماستیتیت گاوی با استفاده از دو روش اگزاسیلین آگار اسکرین و سفوکسیتین دیسک دیفیوژن بود.

روش‌ها

تشخیص ورم پستان در گاوهای شیری

ورم پستان بالینی با مشاهده‌ی تغییرات غیر طبیعی در شیر مانند تغییر رنگ، وجود لخته و نیز تورم، گرمی، درد و قرمزی در حداقل یکی از چهار کارتیه (Quarter) پستان، تشخیص داده شد (۱۶-۱۵، ۲). جهت تشخیص ورم پستان تحت بالینی، از آزمون غیر مستقیم کالیفرنیا ماستیتیس (CMT یا California mastitis test) استفاده شد که جهت شمارش سلول‌های سوماتیک شیر به کار می‌رود. برای انجام این آزمون، ابتدا کارتیه‌ی مورد نظر شستشو و ضد عفونی شد. در مرحله‌ی بعدی، دوشش اولیه دور ریخته شد و مقدار ۲ ml از شیر کارتیه در پلیت مخصوص CMT دوشیده و سپس ۲ ml از محلول شیرآزما به آن افزوده شد و به صورت ملایم چرخش داده شد تا مخلوط شود. سپس نمونه‌ی شیر مورد نظر، از نظر تشکیل رسوب، لخته و یا دلمه مورد بررسی قرار گرفت (۱۸-۱۷).

نتایج واکنش به صورت منفی (بدون هیچ گونه واکنشی)، ضعیف (در طول چرخاندن مخلوط رگه‌هایی قابل مشاهده هستند)، یک مثبت (غلیظ شدن شیر طی چرخش بدون تشکیل دلمه یا ژل)، دو مثبت (تشکیل ضعیف دلمه و ژل و برقراری جریان بسیار آرام طی چرخش در سطح پلیت) و سه مثبت (تشکیل دلمه و ژل جامد چسبیده به بستر پلیت مخصوص) تفسیر شد (۷). کارتیه‌هایی که CMT برابر یک مثبت یا بالاتر داشتند، به عنوان کارتیه‌ی عفونی در نظر گرفته شدند (۱۸، ۱۲، ۷).

جمع‌آوری نمونه‌های شیر

در این مطالعه، تعداد ۴۵۰ نمونه‌ی شیر از گاوهای آلوده به ورم پستان موجود در گاوداری‌های صنعتی استان اصفهان جمع‌آوری گردید. از این میان، ۱۶۰ نمونه مربوط به ورم پستان بالینی و ۲۹۰ نمونه مرتبط با ورم پستان تحت بالینی بودند. جهت

جمع‌آوری نمونه‌های شیر مورد نظر، ابتدا کارتیه‌ی مورد نظر با آب تمیز شستشو شد و بعد از خشک شدن، انتهای هر کارتیه در محل منفذ با پنبه‌ی آغشته به الکل اتانول ۷۰ درصد ضد عفونی گردید. پس از دور ریختن سه دوشش اولیه، مقدار ml ۱۰ شیر، داخل لوله‌ی استریل جمع‌آوری گردید (۱۹). نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده داخل ظرف یخ قرار گرفت و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری شدند (۱۲، ۷).

کشت نمونه‌های شیر و جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس

جهت جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس، مقدار ml ۱ از هر نمونه‌ی شیر منجمد بعد از ذوب شدن در دمای محیط بر روی محیط Baird- Parker agar تلقیح شد. بعد از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در ^{o}C ۳۷، کلنی‌های مشکوک که به شکل کلنی‌های سیاه رنگ و مدور همراه با هاله‌ی شفاف در اطرافشان بودند، بر روی محیط Blood agar ساب کالچر داده شدند و دوباره به مدت ۲۴ ساعت در ^{o}C ۳۷ انکوبه گردیدند (۲۰).

تشخیص قطعی استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس مورفولوژی کلنی‌ها روی محیط Blood agar، ایجاد همولیز بتا، مشاهده‌ی کوکسی‌های گرم مثبت خوشه‌ای در زیر میکروسکوپ پس از رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، کواگولاز لوله‌ای و DNase (Deoxyribonuclease) مثبت صورت گرفت. برای نگهداری نمونه‌ها، محیط مایع تریپتیکاز سوی براث (TSB یا Tryptic soy broth) و یا انفوزیون قلب مغز (BHI یا Brain heart infusion) حاوی ۱۵ درصد گلیسرول به عنوان نگهدارنده به کار رفت و سپس نمونه‌ها در فریزر با دمای ^{o}C ۲۰- نگهداری شدند (۲۱، ۱۸).

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار دیسک

سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland از کشت ۲۴-۱۸ ساعته‌ی باکتری تهیه و روی سطح محیط Mueller-Hinton آگار به صورت یکنواخت و چمنی کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (سیپروفلوکساسین و جنتامایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین و کوتریموکسازول) روی محیط قرار گرفت. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ^{o}C ۳۵ انکوبه شدند و پس از این مدت، قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری و تفسیر گردید. سه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم مشخص شد. لازم به ذکر است که از سویه‌ی استاندارد ATCC۲۵۹۲۹ به عنوان شاهد کیفی استفاده شد (۲۱).

انجام D-test جهت تعیین مقاومت القایی کلیندامایسین (ICR)

D-test (Double disk diffusion test) جهت تعیین مقاومت القایی کلیندامایسین در ایزوله‌های مقاوم به اریترومایسین و حساس به کلیندامایسین صورت گرفت. در این آزمون نیز سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland از کلنی باکتری همانند روش دیسک دیفیوژن تهیه و روی محیط Mueller-Hinton آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های کلیندامایسین و اریترومایسین با فاصله‌ی ml ۲۰-۱۵ از هم بر روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ^{o}C ۳۵ انکوبه شدند. ایجاد یک

هاله‌ی D شکل در اطراف دیسک کلیندامایسین، به عنوان نتیجه‌ی مثبت در نظر گرفته شد (۲۲).

تعیین مقاومت نسبت به متی‌سیلین با روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن

به این منظور، مطابق با پروتکل CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، از کشت ۲۴ ساعته و تازه‌ی باکتری، سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland تهیه و با استفاده از سواپ استریل بر روی محیط Mueller-Hinton آگار به صورت یکنواخت تلقیح شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، دیسک‌های سفوکسیتین (Rosco ۳۰ µg) با استفاده از یک پنس استریل بر روی محیط قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۵ ^{o}C انکوبه و سپس قطر هاله‌های عدم رشد بررسی شد. قطر هاله معادل با ≤ ۲۲ به عنوان مقاوم به متی‌سیلین، ۱۷-۱۵ به عنوان میانه و ≥ ۲۱ به عنوان حساس گزارش شد. از سویه‌ی ATCC۲۵۹۲۳ به عنوان شاهد منفی و از سویه‌ی ATCC۳۳۵۹۱ به عنوان شاهد مثبت استفاده شد (۲۴-۲۳).

تعیین مقاومت نسبت به متی‌سیلین با روش آگار اسکرین

در این روش از محیط کشت Mueller-Hinton آگار حاوی ۴ درصد NaCl و ۶ µg/ml پودر اگزاسیلین استفاده شد. جهت محاسبه‌ی میزان پودر اگزاسیلین مورد نیاز برای تهیه‌ی محیط، از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\text{Weight(mg)} = \frac{\text{volume(ml)} \times \text{concentration}(\frac{\mu g}{ml})}{\text{potency}(\mu g/mg)}$$

از سوسپانسیون معادل با ۰/۵ McFarland که از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری تهیه شده بود، به صورت نقطه‌ای روی محیط‌ها تلقیح شد. سپس پلیت‌ها در ۳۵ ^{o}C قرار گرفتند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، هر گونه رشدی در محل تلقیح به عنوان مقاومت در نظر گرفته شد. در این روش نیز مانند روش دیسک دیفیوژن، از سویه‌های ATCC۲۵۹۲۳ و ATCC۳۳۵۹۱ به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده گردید (۲۵، ۲۱).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC یا Minimum inhibition concentration) اگزاسیلین

حداقل غلظت مهار کنندگی با استفاده از روش آگار Dilution ، برای نمونه‌هایی که در روش اگزاسیلین آگار اسکرین، مقاوم گزارش شدند، تعیین گردید. به این منظور، محیط‌های Mueller-Hinton آگار دارای ۴ درصد NaCl حاوی غلظت‌های متوالی از اگزاسیلین شامل ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ µg/ml تهیه شد. در این روش نیز از فرمول ذکر شده در روش آگار اسکرین، جهت تعیین میزان پودر اگزاسیلین استفاده شد.

از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری، سوسپانسیون معادل ۰/۵ McFarland تهیه و به میزان ۰/۱ رقیق شد تا به غلظت ۱۰۷ CFU/ml رسید. سپس با غلظت نهایی ۱۰۴ CFU/ml در هر قطره، به صورت نقطه‌ای در پلیت‌ها تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۵ ^{o}C قرار گرفتند و بعد از گذشت این مدت زمان، اولین غلظتی از اگزاسیلین که هیچ گونه رشدی روی آن صورت نگرفته بود، به عنوان MIC اگزاسیلین برای سویه‌ی مورد نظر گزارش گردید.

طبق دستورالعمل CLSI، پایین‌ترین میزان MIC اگزاسیلین برای سویه‌های MRSA، بیشتر از

۴ µg/ml و بالاترین میزان MIC نیز بیشتر از ۲۵۶ µg/ml در نظر گرفته شد (۲۷-۲۶).

یافته‌ها

جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه‌های شیر

در مطالعه‌ی حاضر که بر روی نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده از ۲۹۰ رأس گاو آلوده به ورم پستان تحت بالینی و ۱۶۰ رأس گاو مبتلا به ورم پستان بالینی صورت گرفت، تعداد ۵۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۱۲ درصد) جداسازی شد. از این میان، ۴۵ (۱۵/۵۱ درصد) ایزوله مربوط به ورم پستان تحت بالینی و ۹ ایزوله (۵/۶۲ درصد) مربوط به ورم پستان بالینی بودند (جدول ۱).

جدول ۱. تعداد و درصد ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از نمونه‌های شیر مربوط به ورم پستان بالینی و تحت بالینی

نوع ورم پستان	تعداد نمونه‌ی شیر	تعداد ایزوله‌ها (درصد)
بالینی	۱۶۰	۹ (۵/۶۲)
تحت بالینی	۲۹۰	۴۵ (۱۵/۵۱)
کلیه‌ی حالات	۴۵۰	۵۴ (۱۲/۰۰)

آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی و D-test

تمامی ایزوله‌ها به سیپروفلوکساسین و جنتامایسین حساس بودند. تعداد ۳۱ (۵۷/۴ درصد)، ۲۵ (۴۶/۲۹ درصد)، ۸ (۱۴/۸۱ درصد)، ۷ (۱۲/۹۶ درصد) و ۲ (۳/۷۱ درصد) از ایزوله‌ها به ترتیب نسبت به اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین و کوتریموکسازول مقاوم بودند (جدول ۲). D-test برای تمامی سویه‌ها منفی بود.

نتایج روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن

در این روش، از تعداد ۵۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده در این مطالعه، ۱۰ ایزوله (۱۸/۵۱ درصد) به عنوان مقاوم به متی‌سیلین یا MRSA تشخیص داده شدند. از این میان، ۱ (۱۱/۱۱ درصد) ایزوله مربوط به ورم پستان بالینی و ۹ (۲۰/۰۰ درصد) ایزوله با ورم پستان تحت بالینی مرتبط بودند.

نتایج روش اگزاسیلین آگار اسکرین

تعداد MRSAهای شناسایی شده در این روش برابر با ۹ (۱۶/۶۷ درصد) سویه بود. از این میان، ۱ مورد (۱۱/۱۱ درصد) مرتبط با ایزوله‌های جداسازی شده از ورم پستان بالینی و ۸ مورد دیگر (۱۷/۷۸ درصد) مربوط به ایزوله‌های جدا شده از ورم پستان تحت بالینی بودند.

نتایج MIC به روش آگار Dilution

از میان ۹ ایزوله‌ی مقاوم به متی‌سیلین که در روش اگزاسیلین آگار اسکرین تعیین شده بودند، MIC اگزاسیلین برای ۷ مورد از نمونه‌ها، ۱۲۸ µg/ml و برای ۲ ایزوله‌ی دیگر، ۲۵۶ µg/ml بود (جدول ۳).

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی در ایجاد ماستیتیت واگیردار است (۱۰-۹، ۴). منبع اصلی عفونت در این موارد، پستان گاوهای آلوده است که ارگانیسم‌ها را از طریق دست شیردوشان، وسایل شیردوشی و محیط نگهداری گاوها، انتقال می‌دهد.

احتمال می‌رود شیوع بالای استافیلوکوکوس اورئوس در موارد ورم پستان، به پراکندگی گسترده‌ی ارگانیسم درون غدد شیری گاو و روی پوست

جدول ۲. نتایج آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

آنتی‌بیوتیک تعداد و درصد ایزوله‌ها	اریترومایسین	کلیندامایسین	تتراسایکلین	اگزاسیلین	کوتریموکسازول	سیپروفلوکساسین	جنتامایسین
مقاوم	۳۱ (۵۷/۴۰)	۲۵ (۴۶/۲۹)	۸ (۱۴/۸۱)	۷ (۱۲/۹۶)	۲ (۳/۷۱)	۰ (۰)	۰ (۰)
حساس	۲۳ (۴۲/۶۰)	۲۹ (۵۳/۷۰)	۴۶ (۸۵/۱۸)	۴۷ (۸۷/۰۳)	۵۲ (۹۶/۲۹)	۵۴ (۱۰۰)	۵۴ (۱۰۰)

جدول ۳. حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) اگزاسیلین برای سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین در روش اگزاسیلین آگار اسکرین

MIC (µg/ml)	تعداد سویه‌ها (درصد)
۱۲۸	۷ (۷۷/۷۸)
۲۵۶	۲ (۲۲/۲۲)

MIC: Minimum inhibition concentration

ناحیه‌ی سر پستان، وابسته باشد. استافیلوکوکوس اورئوس به خوبی با زنده ماندن در درون غدد شیری گاو تطابق می‌یابد و می‌تواند ورم پستان مزمن و تحت بالینی ایجاد کند. این ارگانیسم، درون شیر دفع می‌شود و به عنوان منبع عفونت برای گاوهای سالم طی شیردوشی عمل می‌کند (۱۶).

با توجه به نتایج این مطالعه، از تعداد ۴۵۰ نمونه‌ی شیر جمع‌آوری شده، ۵۴ (۱۲ درصد) ایزوله استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد که حاکی از شیوع پایین ورم پستان گاوی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس در منطقه‌ی مورد مطالعه است. این نتایج، تأیید کننده‌ی یافته‌های حاصل از مطالعه‌ی ابراهیمی و اخوان طاهری در شهرکرد می‌باشد؛ به طوری که در مطالعه‌ی وی، تنها ۸ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۸/۱۶ درصد) از تعداد ۹۸ نمونه‌ی شیر جداسازی شد (۲۰).

در مطالعه‌ی خان‌ناظر و سرمدی در شیراز نیز از تعداد ۱۳۵۲ نمونه‌ی شیر دریافتی از ورم پستان، ۱۱۸ (۸/۷۳ درصد) ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شد (۲۷). Busato و همکاران، مطالعه‌ای بر روی ۱۹۰۷ گاو شیری مبتلا به ورم پستان در کشور سوئیس انجام دادند. طبق نتایج مطالعه‌ی آن‌ها، میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس ۱۱/۷ درصد بود (۲۸). Phuektes و همکاران نیز ۱۱۷ نمونه‌ی شیر مرتبط با عفونت تحت بالینی ورم پستان را در استرالیا بررسی و ۷ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۵/۹۹ درصد) را جداسازی کردند (۲۹).

همچنین طبق مطالعه‌ی اطیابی و همکاران، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در موارد ورم پستان گاوی در ایران بسیار پایین بود و از تعداد ۲۹۰۴ نمونه‌ی شیر جمع‌آوری شده، تنها ۸۴ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۲/۸۹ درصد) جداسازی گردید (۱۱).

بررسی‌ها نشان داده است که درصد بالایی از عفونت‌های داخل پستانی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، تحت بالینی می‌باشند (۱۲). مانند بسیاری از مطالعات دیگر، در این مطالعه نیز بیشترین تعداد استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده، مربوط به شکل تحت بالینی ورم پستان بود؛ به طوری که از تعداد کل ۵۴ ایزوله، ۴۵ مورد (۱۵/۵۲ درصد) مرتبط با ۲۹۰ نمونه‌ی شیر دریافتی از ورم پستان تحت بالینی بودند. این در حالی است که تنها ۹ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس (۵/۶۲ درصد)، از تعداد ۱۶۰ نمونه‌ی شیر مربوط به ورم پستان بالینی جداسازی شد.

همچنین مطالعه‌ی Abera و همکاران در اتیوپی نیز این نتایج را تأیید می‌کند؛ به طوری که در مطالعه‌ی وی، ۱۰ ایزوله‌ی (۳۳/۳ درصد) استافیلوکوکوس اورئوس از تعداد ۳۰ نمونه‌ی شیر مربوط به ورم پستان بالینی و ۴۹ ایزوله (۴۴/۵ درصد) از تعداد ۱۱۰ نمونه‌ی مرتبط با ورم پستان تحت بالینی، جداسازی شد. طبق نتایج تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی این سویه‌ها در مطالعه‌ی Abera و همکاران، تمامی ایزوله‌ها نسبت به جنتامایسین، کلرامفنیکل، کانامایسین و پلی‌میکسین B، حساس بودند. تعداد ۳۴ ایزوله (۹۴/۴ درصد)، ۲۱ (۵۸/۳ درصد)، ۱۳ (۳۶/۱ درصد)، ۹ (۲۵/۰ درصد) و ۲ (۵/۶ درصد) به ترتیب نسبت به پنی‌سیلین، کوتریموکسازول، آموکسی‌سیلین، مینوسیکلین و استرپتومایسین مقاوم بودند (۱۷).

مسأله‌ی حایز اهمیت دیگر در موارد ورم پستان گاوی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت برخی سویه‌ها به متی‌سیلین و سایر داروهای بتالاکتام است که درمان عفونت ناشی از آن را با مشکلات بسیاری مواجه می‌کند و احتمال انتقال این سویه‌های مقاوم را به جوامع انسانی افزایش می‌دهد (۱۳، ۹). حضور استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) مرتبط با ورم پستان برای اولین بار توسط Devriese و همکاران طی سال‌های ۷۵-۱۹۷۲، با استفاده از روش‌های فنوتیپی در بلژیک گزارش شد (۱۵-۱۴).

در مطالعه‌ی حاضر دو روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن و اگزاسیلین آگار اسکرین به منظور تعیین سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) به کار گرفته شد. با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، تعداد ۱۰ ایزوله‌ی MRSA (۱۸/۵۲ درصد شامل ۹ سویه‌ی مربوط به موارد تحت بالینی و ۱ سویه‌ی مربوط به موارد بالینی ورم پستان) و با روش اگزاسیلین آگار اسکرین، تعداد ۹ ایزوله‌ی MRSA (۱۶/۶۶ درصد شامل ۸ سویه‌ی مربوط به ورم پستان تحت بالینی و ۱ سویه‌ی مربوط به ورم پستان بالینی) شناسایی شد. این نتایج با گزارش‌های ارایه شده توسط Turkyilmaz و همکاران در ترکیه مطابقت داشت؛ چرا که در مطالعه‌ی ایشان، از تعداد ۹۳ ایزوله‌ی استافیلوکوکوس اورئوس عامل ورم پستان گاوی، ۱۶ سویه‌ی MRSA (۱۷/۲ درصد) جداسازی شد (۳۰).

مطالعات اخیر نشان داده است که روش سفوکسیتین دیسک دیفیوژن، نسبت به دیگر روش‌های فنوتیپی نظیر اگزاسیلین آگار اسکرین، برتری دارد و در حال حاضر به عنوان یک روش مناسب جهت تعیین سویه‌های MRSA در بسیاری از مراجع از جمله CLSI پذیرفته شده است (۳۱). با این وجود، استفاده از روش اگزاسیلین آگار اسکرین، به خاطر سهولت انجام و هزینه‌ی پایین‌تر، در آزمایشگاه‌ها ترجیح داده می‌شود (۳۲).

از آن جا که انتظار می‌رود با رعایت مسایل بهداشتی و کنترل آلودگی در گاوداری‌ها، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس به خصوص سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین (MRSA)، بسیار پایین باشد، حتی درصد شیوع ناچیز گزارش شده در مطالعه‌ی حاضر نیز، مشکلات زیادی به دنبال خواهد داشت؛ چرا که احتمال انتقال و سرایت این ارگانیسم‌ها به دیگر گاوها، افراد در تماس نزدیک با دام و به دنبال آن کل جمعیت انسانی وجود دارد.

همچنین عفونت با این سویه‌های مقاوم، درمان دام‌های آلوده را با مشکل مواجه می‌کند، سبب افزایش هزینه‌های درمانی و مرگ و میر دام خواهد شد و خسارات اقتصادی بالایی به صنعت لبنیات کشور وارد می‌کند. به نظر می‌رسد این مقاومت، ناشی از مصرف بی‌رویه، نامناسب و طولانی مدت آنتی‌بیوتیک مورد نظر باشد. بنابراین انجام یک آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی مناسب، قبل از شروع درمان آنتی‌بیوتیکی در موارد ورم پستان گاوی، بسیار حایز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد بهناز اسد بیگی به شماره‌ی ۳۹۲۲۰۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. بدین وسیله از کارکنان محترم گاوداری های فوکا، نصر و فضیل استان اصفهان و کارکنان و مدیر محترم گروه میکروب‌شناسی دانشکده ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Philpot WN, Nickerson SC. Winning the fight against mastitis. Naperville, IL: Westfalia Surge; 2000.
2. Saleki K, Moradi H. Bacterial agents of mastitis in dairy cow farms in Ilam city. J Ilam Univ Med Sci 2013; 20(4): 88-95. [In Persian].
3. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2011; 16(4): 383-407.
4. Schroeder JW. Bovine mastitis and milking management [Online]. [cited 2010]; Available from: URL:http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129.pdf
5. Barker AR, Schrick FN, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. J Dairy Sci 1998; 81(5): 1285-90.
6. Risco CA, Donovan GA, Hernandez J. Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. J Dairy Sci 1999; 82(8): 1684-9.
7. Hashemi M, Kafi M, Safdarian M. The prevalence of clinical and subclinical mastitis in dairy cows in the central region of Fars province, south of Iran. Iran J Vet Res 2011; 12(3): 236-41.
8. Nava H, Tajik P. Evaluation of two screening test, CMT and ECT to detect subclinical mastitis in dairy cow. J Fac Vet Med Univ Tehran 2002; 57(4):91-6.
9. Holmes MA, Zadoks RN. Methicillin resistant S. aureus in human and bovine mastitis. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2011; 16(4): 373-82.
10. Kazemi J, Ahmadi M, Dastmalchi Saei H, Adib Hesami M. The effect of silver nanoparticles and beta-lactam antibiotics individually and in combination on Staphylococcus aureus isolated from cattle mastitis. Vet Microbiol 2012; 8(1): 57-66.
11. Atyabi N, Vodjgani M, Gharagozloo F, Bahonar A. Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Tehran. Iran J Vet Res 2006; 7(3): 76-9.
12. Ghorbanpoor M, Seyfiabad Shapouri M, Moatamedi H, Jamshidian M, Gooraninejad S. Comparison of PCR and bacterial culture methods for diagnosis of dairy cattle's subclinical mastitis caused by Staphylococcus aureus. J Vet Res 2007; 62(4): 87-91.
13. Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Vet Microbiol 2010; 144(1-2): 166-71.
14. Devriese LA, Hommez J. Epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dairy herds. Res Vet Sci 1975; 19(1): 23-7.
15. Devriese LA, Van Damme LR, Fameree L. Methicillin (cloxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis cases. Zentralbl Veterinarmed B 1972; 19(7): 598-605.
16. Mohammad Sadegh M, Askari Badouei M, Gorjidooz M, Daneshvar M and Koochakzadeh A. A study on the clinical Coliform mastitis of Holstein cows on Garmsar suburban dairy farms. Vet Microbiol 2012; 8(2): 137-49.
17. Abera M, Demie B, Aragaw K, Regassa F, Regassa A. Isolation and identification of

Staphylococcus aureus from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town, Ethiopia. J Vet Med Anim Health 2010; 2(3): 29-34.

18. Vojgani M, Gharagozloo F, Bahonar A, Darabi M, Jafari H. Evaluation of therapeutic effects of topical application of eucalyptus essential oil (essence) on experimental mastitis caused by Streptococcus agalactiae. Iran Vet J 2006; 10(12): 5-14. [In Persian].

19. Ghorbanpoor M, Seifiabad Shapouri M, Moatamedi H, Jamshidian M, Gooraninejad S. Comparison of microbial culture, PCR and CMT for diagnosis of dairy cattle's staphylococcal and streptococcal subclinical mastitis. Iran Vet J 2007; 3(1): 63-70.

20. Ebrahimi A, Akhavan Taheri M. Characteristics of staphylococci isolated from clinical and subclinical mastitis cows in Shahrekord. Iran J Vet Res 2009; 10(3): 273-7.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard (M02-A11.). 11th ed [Online]. [cited 2012]; Available from: URL: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/01-CLSI-M02-A11-2012.pdf.

22. Sedighi I, Rasoul Yousefi M, Pak N, Seif Rabiee MA. D-test method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococcus aureus. Iran J Pediatr 2009; 19(3): 293-7.

23. Ghasemian Safai H, Rahimi E. Detection of classical enterotoxins of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine subclinical mastitis in Isfahan, Iran. Vet Microbiol 2010; 141(3-4): 393–4.

24. Anand KB, Agrawal P, Kumar S, Kapila K. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for mecA gene for detection of MRSA. Indian J Med Microbiol 2009; 27(1): 27-9.

25. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, Sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Antibiotic profile of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with multiple-drug resistances isolated from nosocomial infections in Vali-Asr Hospital of Arak. J Arak Univ Med Sci 2013; 16(71): 29-37. [In Persian].

26. Caierao J, Superti S, Dias CA, d'Azevedo PA. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(3): 277-80.

27. Khan Nazer A. H, Sarmadi R. Prevalence of clinical and subclinical mastitis, antibiotic resistance and determination of minimum inhibitory Concentration (MIC) in Staphylococcus aureus and Escherichia coli isolated from cases of bovine Mastitis. J Vet Res 2005; 60(3): 247-52.

28. Busato A, Trachsel P, Schallibaum M, Blum JW. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. Prev Vet Med 2000; 44(3-4): 205-20.

29. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus and streptococcal causes of bovine mastitis. J Dairy Sci 2001; 84(5): 1140-8.

30. Turkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdogan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine milk. Zoonoses Public Health 2010; 57(3): 197-203.

31. Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Moller N, Olsson-Liljequist B, et al. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother 2003; 52(2): 204-7.

32. Shariati L, Validi M, Tabatabaiefar MA, Karimi A, Nafisi MR. Comparison of real-time PCR with disk diffusion, agar screen and E-test methods for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Curr Microbiol 2010; 61(6): 520-4.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 07.05.2014
Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014
Accepted: 08.08.2014

Investigation of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of Methicillin-Resistant Strains (MRSA) in Staphylococcus Aureus Isolates Associated with Bovine Mastitis

Sayed Asghar Havaei PhD[1], Bahram Nasr Esfahani PhD[1], Nafisehsadat Hoseini MSc[2], Behnaz Assadbeigi[3]

Original Article

Abstract

Background: Staphylococcus aureus is one of the main causative agents in bovine mastitis. Resistance of some Staphylococcus aureus strains to antibiotics, particularly methicillin, can complicate the treatment of its infections. Moreover, the transmission of resistant strains into human is also important. Thus, the aim of this study was to investigate the prevalence of mastitis caused by Staphylococcus aureus in Isfahan dairy herds, Iran, and to determine the antimicrobial susceptibility pattern of the isolates.

Methods: A total of 450 milk samples were collected. After inoculation and applying the relevant tests, antibiotic resistance was determined via disk diffusion method in isolates. D-test method was performed for the detection of inducible clindamycin resistance (ICR). Then, methicillin-resistant strains (MRSA) were detected using oxacillin agar screening and cefoxitin disc diffusion methods.

Findings: Fifty-four Staphylococcus aureus were isolated. All isolates were sensitive to ciprofloxacin and gentamicin. Furthermore, 31, 25, 8, 7 and 2 isolates were resistant to erythromycin, clindamycin, tetracycline, oxacillin and cotrimoxazole, respectively. D-test was negative for all isolates. Nine methicillin-resistant strains were identified using oxacillin agar screening and ten methicillin-resistant strains were detected using cefoxitin disc diffusion methods.

Conclusion: Since it is expected that the prevalence of Staphylococcus aureus, especially antibiotic resistant strains in herds, be too negligible, even the low incidence reported in this study can lead to many problems. Therefore, applying an appropriate antimicrobial susceptibility test before the beginning of antibiotic therapy in bovine mastitis cases is of primary importance.

Keywords: Bovine mastitis, Staphylococcus aureus, Antibiotic resistance, Methicillin-resistant strains

Citation: Havaei SA, Nasr Esfahani B, Hoseini N, Assadbeigi B. **Investigation of Antibiotic Resistance Pattern and Detection of Methicillin-Resistant Strains (MRSA) in Staphylococcus Aureus Isolates Associated with Bovine Mastitis** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): 1319-29

1- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Behnaz Assadbeigi, Email: beh69766@yahoo.com