شرکت کشت و دامداری فکا

www.fkaco.ir

انتخاب درمان آنتی بیوتیکی برای ورم پستان گاوهای شیری

MEHDI KAZEMI
FKACO
Jan 2018

ورم پستان بیشترین بیماری مشترک در گاوهای شیری است و ادامه یافتن آن منجر به زیان‌های شدید اقتصادی برای صنعت گاو شیری می‌شود. نتایج ورم پستان در کاهش شیر و هزینه‌های مربوط به درمان برای دامدار ۱۷۹ دلار برای هر مورد است. از کل این ۱۷۹ دلار، تنها ۵۰ دلار شامل هزینه‌های مربوط به درمان است(Bar et al,2008). زمانیکه مورد ورم پستان بالینی مشاهده می‌شود، بالافاصله مقابله آنتی بیوتیکی معمولا بوسیله دامدار پذیرفته است، هرچند، گزارش شده است که ۱۰ تا ۴۰ درصد کشت‌های میکروبی از موارد ورم پستان بالینی حاصل رشد باکتری‌ها نیست و از این رو نیاز به درمان آنتی میکروبی ندارد(Roberson 2003). بعلاوه، ورم پستان‌های رخ داده بوسیله باکتری‌های کلی فرم، یک بیماریزای محیطی عادی ورم پستان است که خیلی اوقات بدون درمان حل می‌شود. بلاخره، بیشتر آنتی میکروب‌های داخل پستانی برای استفاده در گاوهای شیری تأئید شد که بیشتر برای مقابله گسترده برای گرم مثبت‌ها است و کاهش احتمالی موثر بر موارد ورم پستان کلی فرمی دارد.از این رو سوال منطقی این است که اگر درمان انتخابی شروع شود می‌تواند بیشتر موثر باشد. شروع درمان انتخابی برای ورم پستان بالینی مستلزم استراتژی دو مرحله‌ای با شناسائی بیماریزای اولیه، به دنبال آن بوسیله تصمیم برای درمان بر اساس نتایج است. این مورد انتظار است که شروع درمان انتخابی، استفاده از آنتی میکروب‌ها و همچنین هزینه‌های مربوط به درمان را برای دامدار کاهش دهد. با درمان انتخابی، شیر بیشتری از گاوهایی که درمان شده اند محدود خواهد شد که ناشی از به تأخیر انداختن درمان است. اما، در مجموع در گله کامل، کل شیر محدود شده ممکن است کاهش یابد زیرا هر گاو با ورم پستان بالینی درمان نخواهد شد. آنتی میکروب انتخابی مورد استفاده برای موارد ورم پستان به دامدار اجازه می‌دهد در درمان موثر ورم پستان با کاهش هزینه‌های درمان(Makovec and Ruegg,2003;Schukken et al,2011).

استراتژی درمان انتخابی بوسیله دامدار با استفاده از یک تصمیم ساده (بله/خیر) بر اساس اطلاعات سیستم‌های کشت میکروبی یک مزرعه یا آزمایشگاه بر اساس روش‌های تشخیص عامل بیماریزای real-time PCR می‌تواند اجرا شود.

تشخیص

برای یافتن عوامل بیماریزای ورم پستان، روش استاندارد طلائی رایج کشت میکروبیولوژی برای شناسائی باکتری‌ها است(انجمن ملی ورم پستان ۱۹۹۶). کشت آزمایشگاهی می‌تواند پاتوژن را در ۴۸-۲۴ ساعت(یا بیشتر) بعد از گرفتن نمونه شناسائی کند منوط به این که نمونه هرچه سریعتر برای تشخیص به آزمایشگاه فرستاده شود. از اینرو ۴۸-۲۴ ساعت نتایج بدست آمده تفسیر شده و شناسائی این که آیا پاتوژن گرم مثبت یا گرم منفی است کشت آزمایشگاهی برای انتخاب درمان آنتی بیوتیکی اجازه می‌دهد. اخیرا، سه روش تشخیص برای

دامداران وجود دارد که برای شناسائی پاتوژن در مقایسه با کشت آزمایشگاهی سنتی زمان کاهش می‌یابد:۱- سیستم کشت آسان مینه سوتا II ۲- سیستم پتری فیلم ۳- PCR

سیستم‌های کشت درون مزرعه‌ای

دو سیستم کشت درون مزرعه‌ای برای کمک به پیشگیری و به تأخیر انداختن و زمان نتایج بوسیله کشت آزمایشگاهی است. سیستم کشت آسان مینه‌سوتا II (دانشگاه مینه‌سوتا) و سیستم پتری فیلم(میکروب شناسی 3M) سیستم‌های درون مزرعه‌ای هستند. دامداران میتوانند از این سیستم‌ها در مزرعه، بدون نیاز به آزمایشگاه خارجی برای تشخیص پاتوژن ورم پستان استفاده کنند.

سیستم کشت آسان مینه‌سوتاII

سیستم کشت آسان مینه‌سوتا II یک سیستم دو بخشی که یک طرف حاوی آگار MacConkey برای رشد دادن اورگانیسم‌های گرم منفی و سمت دیگر حاوی آگار فاکتور برای رشد دادن اورگانیسم‌های گرم مثبت است(شکل ۱).

در شیوه استفاده از صفحه دو بخشی در مزرعه، به یک انکوباتور و فضای آزمایشگاهی تمیز برای کشت مناسب و تخیص باکتری‌ها نیاز است. نمونه شیر سترون انتخاب شده بر روی آگار پخش می‌شود و ظرف پلیت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار داده می‌شود که در این روش با رشد باکتری‌ها مشخص می‌شود کدام کوارتر آلوده شده است. بستگی به رشد باکتری‌ها، عامل بیماریزا می‌تواند به عنوان گرم مثبت یا گرم منفی ظرف ۲۴ تا ۴۸ ساعت در مزرعه طبقه‌بندی شود. این سیستم اثرات عوامل بیماریزای ورم پستان با طبقه‌بندی رایج گرم مثبت و گرم منفی را مشخص می‌کند اما اگر نمونه غلظت کمی از باکتری‌ها یا اگر عامل بیماریزا بر روی ظرف رشد نکند محدودیت وجود دارد(Lago et al,2014;Sears et al,1990). این سیستم می‌تواند همچنین گونه‌های باکتری را با استفاده از نسخه پلیت سه بخشی به صورت ویژه طبقه‌بندی کند که گونه‌های استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس را شناسائی می‌کند.

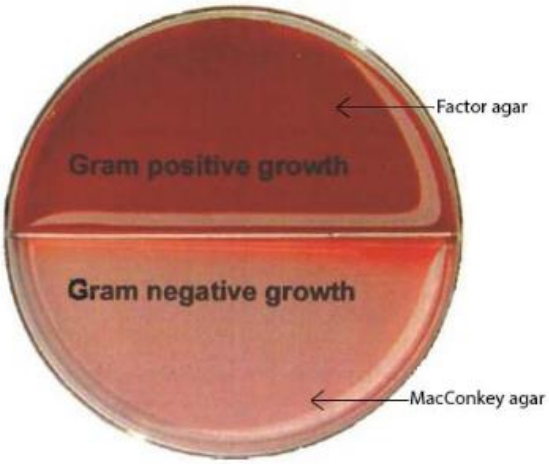

Figure 1. Bi-plate of Minnesota Easy Culture System II. (Top: Factor agar. Bottom: MacConkey agar.)
Credits: University of Minnesota Laboratory for Udder Health (2004)

سیستم پتری فیلم

نتایج سیستم پتری فیلم را می‌توان تنها در ۲۴ ساعت اکوباسیون مشخص کرد(Graber et al,2007). این پلیت برای تعیین عوامل بیماریزای خاص مانند گونه‌های استافیلوکوکوس(باکتری گرم مثبت) یا گونه‌های کلیفرم(باکتری گرم منفی) طراحی شده است. شیر استریل جمع‌آوری شده از کوارتر آلوده را می‌توان با استفاده از پیپت به مرکز پلیت منتقل کرد و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون کرد. بعد از ۲۴ ساعت، کلنی‌های باکتری‌ها را میتوان در پلیت مشاهده کرد. پلیت پتری فیلم شمارش سریع استاف(STX) برای رنگ آمیزی کلنی‌های مختلف برای شناسائی گونه‌های استاف، باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ برای مثال کلنی قرمز-بنفش برای استافیلوکوکوس اورئوس است(شکل ۲).

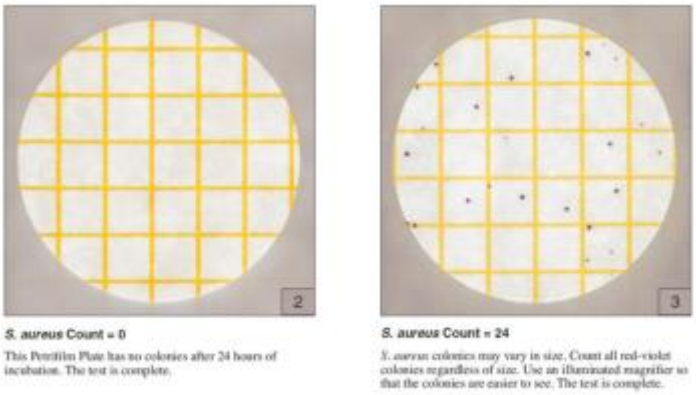

Figure 2. 3M Petrifilm Staph Express Count Plate.
Credits: Pinzón-Sánchez, Cabrera, and Ruegg (2011)

کاربرد مناسب سیستم کشت درون مزرعه‌ای نیازمند طراحی مکان مناسب کشت در مزرعه که در این شیوه باکتری‌های بی خطر رشد کنند، همچنین که چه کسی پلیت‌ها را برای تشخیص عامل بیماریزا قرائت می‌کند.

آموزش بوسیله دامپزشکان در جمع‌آوری استریل نمونه‌های شیر که در این شیوه برای جلوگیری از انتقال آلودگی نمونه‌ها نیاز به تشخیص پیشنهاد شده است. استفاده از سیستم کشت درون مزرعه‌ای نشان داده است که نتایج با کاهش معنی‌داری در دور ریختن شیر و ۵۰٪ کاهش در استفاده آنتی میکروبی بوسیله استفاده از درمان-های مختلف تمام موارد درمان می‌شود(Lago et al,2011). هر دو سیستم کشت درون مزرعه‌ای می‌تواند به عنوان تشخیص پر بازده و سودمند و انتخاب درمان برای عفونت‌های ورم پستان به دامداران کمک کند.

Real-time PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی وقفه(PCR) بر اساس روش‌های ردیابی نسبت به دیگر روش‌های حساس و سریع در شناسائی باکتری‌ها استفاده می‌شود. این روش قابلیت شناسائی عوامل بیماریزای ویژه را تنها در کمترین ساعت دارد. روش‌های بر اساس PCR با ردیابی DNA در باکتری‌های ویژه در نمونه‌های شیر از طریق تقویت DNA باکتری‌ها صورت می گیرد.

روش‌های بر اساس PCR نیازمند قابلیت‌های تکنیکی بیشتری است، اما این روش نسبت به روش‌های بر اساس کشت بیشتر حساس، ویژه و سریعتر است. یک مطالعه بوسیله Phuektes,Mansell, and Browning(2001) یافتند که آزمایش PCR زمانیکه با کشت برای شناسائی استاف.اورئوس و استاف.اووبریس مقایسه می‌شود معنی‌داری بیشتری در حساسیت دارد. روش‌های بر اساس PCR همیشه می‌تواند عامل بیماریزا را در نمونه‌های شیر که زمانیکه کشت داده شده‌اند و رشد نکرده‌اند را تشخیص دهد(3M Microbiology,2010). تشخیص بر اساس PCR قابلیت شناسائی یک یا چند اورگانیسم مسبب ورم پستان را شناسائی کند(Gillespie and Oliver,2005;Koskinen et al,2010). آزمایش PCR ورم پستان پاتوپروف(PathoProof) اخیرا یک تکنولوژی تشخیصی PCR است که می‌تواند یازده عامل بیماریزای ورم پستان را شناسائی کند.

آزمایش ورم پستان پاتوپروف می‌تواند بوسیله شیر مستقیم از کارتیه آلوده و آماده کردن نتایج در ۴ ساعت با استفاده از استخراج DNA از نمونه عمل کند(Koskinen et al,2010). نمونه شیر باید به صورت استریل برای جلوگیری از انتقال آلودگی به نمونه جمع‌آوری شود. اگر انتقال آلودگی به نمونه رخ دهد، تکنولوژی PCR ممکن است چندین عامل بیماریزا را تشخیص دهد که پیشنهاد یک درمان موثر را دشوار می‌سازد. روش شناسائی PCR معمولا در آزمایشگاه‌های تشخیصی اجرا می‌شود. شناسائی عامل بیماریزا با PCR را می‌توان در مزرعه نیز اجرا کرد به شرطی که یک مکان آزمایش تمیز برای جدا سازی DNA از نمونه شیر و تجهیزات PCR مورد نیاز است که آزمایش انجام شود. تجهیزات PCR برای آزمایش نسبت به تجهیزات کشت بیشتر گران قیمت است. که نیازمند آموزش ومهارت برای فرایند نمونه شیر و انتقال آن به دستگاه PCR است.

همچنین اگر نمونه‌های شیر را به آزمایشگاه‌های تجاری بفرستید تشخیص بر اساس PCR سرجمع گران خواهد شد و به یک شخص آموزش دیده نیاز است. روی هم رفته، روش‌های شناسائی بر اساس PCR میتواند نمونه-های شیر را در کمترین ساعت تشخیص دهد و مشکلات وابسته به روش‌های شناسائی کشت دادن مانند رشد نکردن یا قرائت موثر پلیت‌ها را ندارد.

هر روش شناسائی عامل بیماریزا در طبقه‌بندی عامل بیماریزای مسبب عفونت سودمند است. هر سیستم وویژگی‌های منحصر به فرد خود را دارد که به کاربر اجازه می‌دهد که تصمیم بگیرد که کدام سیستم می‌تواند در مزرعه بهتر مدیریت شود(جدول ۱).

Table 1. Characteristics of three bacterial identification systems.

Characteristics	Minnesota Easy Culture System II	Petrifilm	Real-time PCR
Cost per sample	++[a]	++	+[b]
Time to results	18–24 h	24–48 h	4 h
Ease of use	+	+	++
Identifies gram +/–	+	+	+
Identifies individual pathogens	+	+	++

[a]++ indicates the method is better for that characteristic
[b]+ indicates this method is good for that characteristic

درمان

یک عامل بیماریزا شناسائی شده به عنوان گرم مثبت یا گرم منفی که در سیستم کشت یا روش‌های بر اساس PCR استفاده می‌شود، تصمیم برای درمان می‌تواند بر اساس نوع عامل بیماریزا ساخته شود.موارد جدید ورم پستان که بوسیله عامل بیماریزای گرم مثبت ایجاد شده باید با آنتی میکروب‌ها درمان شود، در صورتیکه مواردی که بوسسیله عوامل بیماریزای گرم منفی ایجاد شده باید بدون درمان مرخص شود زیرا آنها به خودی خود درمان می‌یابند(Lago et al,2014). شناسائی پاتوژن می‌تواند ارزشمند باشد که تلاش دامداری‌های مدرن ایالات متحده پاتوژن ورم پستان واگیردار را به خوبی کنترل کرده‌اند و کشت منفی یا ورم پستان گرم مثبت اغلب بیشتر از نصف موارد بالینی است؛ برای مثال، در یک گزارش ۲۷٪ موارد ورم پستان حاصل از پاتوژن گرم منفی است و ۳۲٪ باکتری‌ها رشد نکرده‌اند(Lego et al,2014). زمانیکه پاتوژن به عنوان گرم مثبت شناسائی شد بلافاصله کشت دهید یا با کمک PCR می‌توان گوونه‌های باکتری را شناسائی کرد. با رجوع به جدول ۲ برای آنتی میکروب‌های رایج در فروشگاه را می‌توان برای پاتوژن‌های گرم مثبت خاص استفاده کرد. به این ترتیب بلافاصله بعد از کشت پاتوژن گرم مثبت هر روز و کشت روزمره تانک شیر می‌توان انواع پاتوژن‌های گرم مثبت در گله را شناسائی کرد. تصمیم برای درمان گرم مثبت می‌توان بر اساس یک طیف رنگی از پاتوژن‌ها در تانک شیر ساخته شود.

درمان باید مرتبا بوسیله مشاهده نرخ بهبودی ورم پستان برای تعیین این که درمان موثر بود است، مورد سنجش قرار گیرد.

Table 2. Selective antibiotics for bacterial species for mastitis treatment of dairy cows.

Type	Bacterial species	Antimicrobial	Product Name	Drug Type
Gram-positive	*Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae*	Amoxicillin trihydrate	Amoxi-Mast (Merk)	Rx[a]
Gram-positive and gram-negative	*coagulase-negative staphylococci, Streptococcus dysgalactiae,* and *Escherichia coli*	Ceftiofur hydrochloride	Spectramast LC (Zoetis)	Rx
Gram-positive	*Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*	Cephapirin sodium	Today (Boehringer-Ing.)	OTC[b]
Gram-positive	*Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*	Cloxacillin sodium	Dariclox (Merck)	Rx
Gram-positive and gram-negative	*Streptococcus agalactiae, S. dysgalactiae, Staphylococcus aureus,* and *Escherichia coli.*	Hetacillin (potassium)	Hetacin K (Boehringer-Ing.)	Rx
Gram-positive	*Staphylococcus species*	Pirlimycin	Pirsue (Zoetis)	Rx

Source: FARAD's *VetGram* (2014)
[a] Rx drugs are available only by veterinary prescription.
[b] OTC drugs are available over the counter.

نتیجه

در نتیجه، کشت درون مزرعه‌ای به دامدار اجازه می‌دهد تا بیشتر تشخیص‌های موثر و بر اساس نوع پاتوژن در حال حاضر گاوها را درمان کند. درمان بر اساس پاتوژن نتیجه خوبی در کاهش استفاده از آنتی میکروب‌ها دارد، زیرا موارد ورم پستان که کشت منفی دارد یا بوسیله باکتری‌های گرم مثبت باعث شده ایجاد شده را می-توان بدون درمان رها کرد. درمان احتیاطی برای موارد ورم پستان هر جا مشابه موارد ورم پستان جدید که بوسیله پاتوژن‌های گرم مثبت ایجاده شده است بیشتر سودمند است. روش‌های بر اساس Real- time PCR پیشنهاد شده سریعتر و با حساسیت بیشتری پاتوژن باکتریایی ورم پستان را شناسائئی می‌کند. با کشت مزرعه‌ای مقایسه شده، اما روش‌های بر اساس PCR هزینه بالاتری دارد و وابسته به یک آزمایشگاه تجاری خارج از مزرعه است.

منابع

3M Microbiology. 2010. 3M Petrifilm Staph Express Count Plate Interpretation Guide. Saint Paul, MN: 3M Food Safety.

Bar, D., L. W. Tauer, G. Bennett, R. N. Gonzalez, J. A. Hertl, Y. H. Schukken, H. F. Schulte, F. L. Welcome, and Y. T. Grohn. 2008. "The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated using dynamic programming." J. Dairy Sci. 91: 2205–2214.

Food Animal Residue Avoidance Databank (FARAD). Vet GRAM. N.d. Web. Accessed May 5, 2014. http://www.farad.org/vetgram/search.asp.

Gillespie, B. E., and S. P. Oliver. 2005. "Simultaneous detection of mastitis pathogens Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, and Streptococcus agalactiae by multiplex real-time polymerase chain reaction." J. Dairy Sci. 88:3510–3518.

Graber, H. U., M. G. Casey, J. Naskova, A. Steiner, and W. Schaeren. 2007. "Development of a highly sensitive and specific assay to detect Staphylococcus aureus in bovine mastitic milk." J. Dairy Sci. 90: 4661–4669.

Koskinen, M. T., G. J. Wellenberg, O. C. Sampimon, J. Holopainen, A. Rothkamp, L. Salmikivi, W. A. van Haeringen, T. J. Lam, and S. Pyörälä. 2010. "Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria."J. Dairy Sci.93:5707–5715.

Lago, A., S. M. Godden, and P. L. Ruegg, P. L. 2014. "Treat or not treat? Etiology-based treatment decisions for clinical mastitis." NMC 53rd Annual Meeting Proceedings: 43–63, Fort Worth, TX.

Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie, K. 2011. "The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes." J. Dairy Sci. 94: 4441–4456.

Makovec, J. A., and P. L. Ruegg. 2003. "Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001."J. Dairy Sci.86: 3466–3472.

National Mastitis Council. 1996. Current Concepts of Bovine Mastitis. 4th ed. NMC, Madison, WI.