بررسی مقاومت میکروبی کلستریدیوم پرفرنجنس تجرید شده از گوسفندان نخاس کمپنی شهر کابل

پوهنمل محمدنعیم عل ی زاده[۱]، قدیر شیرزاد[۲]

[۱،۲]دیپارتمنت پاراکلینیک، پوهنځی علوم وترنری، پوهنتون کابل، کابل، افغانستان

ایمیل: naiemalizada4455@gmail.com

چکیده

کلستریدیوم پرفرنجنس یک باکتری گرام مثبت، چوبک‌مانند، غیرهوازی مطلق، سپور دار و غیر متحرک است، که سبب بیماری انتروتوکسیمیا، سترک و نرم شدن گـرده در نزد گوسفندان مـی‌شود. این باکتری از نگاه بیماری‌زایی به ۵ تایپ (A, B, C, D, E) طبقه‌بندی شده است. این تحقیق بالای ۲۰ نمونه مواد غایطه گوسفندان مبتلا به اسهال از نخاس کمپنی جمع آوری و نمونه‌ها توسط کول باکس در تحت شرایط معقم به لابراتوار انتقال گردید. ابتدا نمونه‌ها در حمام آبی در ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعداً نمونه‌ها را در وسط مایع DRCM کشت، که ۷ (۳۵٪) نمونه بعد از سیاه نمودن وسط مثبت دریافت گردید. نمونه‌های مثبت را به وسط جامد آگرخوندار دوباره کلچر، رنگ آمیزی گرام نموده و در نتیجه، با انجام آزمایش انتی‌بیوگرام بالای نمونه‌های مثبت، باکتری متذکره در برابر ۱۳ (۷۲,۲ ٪) انتی‌بیوتیک مقاوم، ۳ (۱۶,۷ ٪) انتی‌بیوتیک حساس و ۲ (۱۱,۲ ٪) انتی‌بیوتیک حساسیت متوسط از خودشان نشان دادند.

اصطلاحات کلیدی: تجرید؛ رنگ آمیزی گرام؛ کلستریدیوم پرفرنجنس؛ گوسفند؛ مقاومت میکروبی

Assessing the Microbial Resistance of Clostridium Perfringens Isolated From Sheep in Animal Market of Kompany, Kabul

Sr. Teaching Asst. Mohammad Naiem Alizada[1], Qadir Shirzad[2]

[1.2]Department of Paraclinic, Faculty of Veterinary Science, Kabul University, Kabul, Afghanistan

Email: naiemalizada4455@gmail.com

Abstract

Clostridium perfringens is a gram-positive, rod-shaped, spore-forming, obligate anaerobic, and non-motile bacterium. It causes enterotoxemia, struck, and pulpy kidney disease in sheep and is classified into five types (A, B, C, D, and E) based on pathogenicity. This research was conducted on 20 fecal samples from sheep suffering from diarrhea at the Kompany, Kabul City animal market. The samples were transferred to the laboratory under sterile conditions using a cool box. Initially, the samples were placed in a water bath at 80 degrees Celsius. Subsequently, we cultured the samples in Differential Reinforced Clostridia Medium (DRCM) liquid medium, and 7 (35%) of the samples turned the medium black, indicating a positive result. The positive samples were then subcultured on blood agar solid medium and stained with Gram stain. An antibiogram test performed on the positive samples revealed that the bacteria were resistant to 13 (72.2%) antibiotics, sensitive to 3 (16.7%) antibiotics, and moderately sensitive to 2 (11.1%) antibiotics.

Keywords: Isolation; Gram Staining; Clostridium Perfringens; Sheep; Microbial Resistant

مقدمه

مالداری در افغانستان از اهمیت خاصی برخودار می‌باشد. پوست، روده و پشم اقلام مهم صادراتی کشور را تشکیل می‌دهند. گوسفندان به هدف تولید گوشت، شیر، پشم و نسل‌گیری در افغانستان مورد پرورش قرار می‌گیرند. با افزایش تقاضا برای محصولات حیوانی، نگهداری و حفظ سلامتی گوسفندان از اهمیت بیشتری برخوردار شده است. یکی از مشکلات قابل ملاحظه در بین گوسفندان، بیماری‌های باکتریایی است که می‌تواند عوارض جدی برای صحت و تولید گوسفندان ایجاد کنند. از این‌رو، بیماری انتروتوکسیمیا که بنام بیماری سرخ‌روده نیز یاد می‌شود، توسط کلستریدیوم پرفرنجنس[۱۸۷] تولید می‌شود، از جمله بیماری‌هایی می‌باشد که بیشتر در فصل زمستان و بهار و زمان که مواد خوراکی حیوان در حال تغییر است واقع می‌شود. بنابراین، این بیماری سالانه سبب خسارات بزرگ اقتصادی از اثر تلف شدن گوسفندان در گوسفندان واکسین‌نشده می‌گردد. تحقیقات در مورد این بیماری در افغانستان تاهنوز به شکل شاید و باید آن انجام نشده است. همچنان مقاومت میکروبی که یکی از مشکلات فراه راه صحت عامه و صحت حیوانی است که از اثر مصرف بی‌رویه‌ی انتی‌بیوتیک‌ها در ساحه وترنری به‌حیث مشوق نمو و تداوی بیماری‌ها به حیوانات تجویز می‌شود، به وجود می‌آید. بنابراین، در این تحقیق بررسی مقاومت میکروبی کلستریدیوم پرفرنجنس تجریدشده از گوسفندان در نخاس کمپنی شهر کابل مورد بحث قرار گرفته است که هدف عمده این تحقیق تجرید باکتری و دریافت مقاومت میکروبی آن را تشکیل می‌دهد.

اهداف

هدف این تحقیق تجرید و شناسایی کلاستریدیوم پرفرنجنس و دریافت مقاومت میکروبی آن از گوسفندان می‌باشد. این معلومات می‌تواند به ما کمک کند تا چگونگی شیوع بیماری را در جغرافیای مختلف کشور در بین گوسفندان و شرایط محیطی متفاوت، مورد بررسی قرار دهیم.

به‌طور کلی، انجام این تحقیق به شناخت دقیق‌تر کلاستریدیوم پرفرنجنس در گوسفندان، کاهش خسارات بیماری‌های مرتبط با آن و افزایش تولید آن‌ها و صحت گله‌های گوسفند کمک خواهد کرد. همچنان، نتایج این تحقیقات می‌توانند به انکشاف روش‌های تشخیصی مؤثرتر برای شناسایی کلاستریدیوم پرفرنجنس در گوسفندان سبب شود که باعث بهبود وضعیت صحی گله‌های گوسفند و افزایش تولیدات در صنعت مالداری کشور خواهد شد.

---

[۱۸۷] Clostridium perfringens

اهمیت تحقیق

- اقتصادی: کلستریدیوم پرفرنجنس سبب مرگ گوسفندان مخصوصاً برهها بعد از تغییر رژیم غذایی شان میشود. که در این صورت اگر شناسایی و کنترول نشود خسارات بزرگ اقتصادی را متوجه مالدار میسازد.
- بهبود حفظ الصحه عمومی: شناسایی کلاستریدیوم پرفرنجنس در گوسفندان میتواند بهبود حفظالصحه عمومی جامعه را نیز به همراه داشته باشد. این باکتری ممکن است عامل انتقال بیماری به انسان باشد و با شناسایی و کنترول آن در گوسفندان، خطر انتقال بیماری به انسان را کاهش دهد.
- بهبود تولیدات حیوانی: کلاستریدیوم پرفرنجنس میتواند عامل ایجاد بیماریهای خطرناکی مانند انتروتوکسیمیا در گوسفندان باشد که منجر به کاهش تولیدات حیوانی، افزایش مصرف انتیبیوتیکها و ایجاد خسارتهای اقتصادی میشود.

با توجه به اهمیت متذکره، تحقیق در زمینه تجرید و شناسایی کلاستریدیوم پرفرنجنس در گوسفندان نخاس شهر کابل میتواند به بهبود حفظ الصحه عمومی، بهرهبرداری حیوانی و صحت عمومی جامعه کمک کند.

پیشینه

کلستریدیوم پرفرنجنس باکتری چوبکمانند، گرام مثبت، سپوردار، غیرهوازی مطلق و غیر متحرک است که سبب بیماری در نزد انسانها و حیوانات میشود (۱–۳). باکتری متذکره برای اولین بار توسط داکتران ویلیام و ویلچ[۱۸۸]، در سال ۱۸۹۱ م در شفاخانه جان هاپکینز پس از انجام دوخت بر روی جسد یک مرد ۳۸ ساله کشف شد و در ابتدا بنام جینس باسیلوس کپسولاتوس[۱۸۹] شناخته شد. بعداً به باسیلوس ولچی[۱۹۰] تغییر یافت و در نهایت به کلستریدیوم پرفرنجنس تغییر نام داده شد (۴). باکتری یاد شده بیشتر در خاک، آب، مدفوع حیوانات و انسانها و محصولات گوشتی دریافت میگردد (۵). از اینرو، این مایکروارگانیزم میتواند به صورت طبیعی در سیستم هاضمه برخی از حیوانات و انسانها موجود باشد؛ اما در شرایط خاص میتواند باعث ایجاد بیماریهای خطرناک شود. بنابراین، کلستریدیوم پرفرنجنس در محدودهی از pH ۵,۵ تا ۷ و حرارت ۲۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد رشدنموده است؛ اما بهطور معمول در ۳۷ درجه سانتیگراد رشد مینماید. معمولاً کلستریدوم پرفرنجنس در شکل یک باسیل شدیداً گرام مثبت و کوتاه آشکار میشود(٦).

188 William and Welch
189 Bacillus capsulatus
190 Bacillus Welchi

کلستریدیوم پرفرنجنس مسئول عفونت‌های روده‌یی و همچنان بیماری‌های هیستوتوکسیک در حیوانات است که میزان شیوع پائین (۲ تا ۸ ٪) اما میزان مرگ و میر بسیار بالا (۱۰۰ ٪) دارد (۷) . بنابراین، میزیان شیوع انتروتوکسیمیا در بین گوسفندان و بزها ۲۴,۱۳ الی ۱۰۰ ٪ است (8). مطالعات اخیر نشان داده است که ۱۷ نوع توکسین توسط این باکتری ترشح می‌شود که چهار نوع آن‌ها توکسین‌های اصلی می‌باشند. کلستریدیوم پرفرنجنس از نگاه بیماری‌زایی و با توجه به تولید ۴ توکسین اصلی الفا (*CPA*)، بیتا (*CPB*)، اپسیلون (*ETX*) و آیوتا (*IOTA*) به ۵ تایپ (A، B، C، D و E) طبقه‌بندی شده است. مشخصات توکسین‌های عمده کلاستریدیوم پرفرنجنس در جدول توضیح شده است (۹،۱).

جدول۱: مشخصات توکسین‌های کلاستریدیوم پرفرنجنس و بیماری‌های وابسته به آن در گوسفندان (۹)

تایپ کلستریدیوم پرفرنجنس	نوع بیماری
تایپ A	بیماری بره زرد[۱۹۱]
تایپ B	بیماری دیزنتری بره‌ها و التهاب هیموراژیک روده‌ها
تایپ C	بیماری سترک
تایپ D	بیماری نرم شدن گرده
تایپ E	بیماری انتروتوکسیمیا

علاوه براین، همه این توکسین‌ها به‌صورت موضعی عمل نموده و یا در روده جذب و باعث عفونت روده‌ها می‌شود که به‌طور کلی به‌حیث بیماری انتروتوکسیمیا در گوسفند و بز نامیده می‌شود. با این حال، شدت این عفونت‌ها به نوع و ترکیب توکسین‌های متذکره بسته‌گی دارد که معمول‌ترین علت انتروتوکسیمیا در گوسفند و بز است (۱۰). انتروتوکسیمیا یک بیماری مهم در گوسفند است که توسط کلستردیوم پرفرنجنس تولید می‌شود و بنام بیماری پرخوری نیز یاد می‌شود؛ زیرا اغلب با مصرف ناگهانی خوراک پرانرژی؛ مانند غلات یا علوفه سرسبز تولید می‌شود. مصرف سریع چنین خوراکی می‌تواند پروسه تخمیر طبیعی در شکمبه گوسفند را مختل کند و منجر به شرایط مساعد برای تکثیر کلستردیوم پرفرنجنس شده و سبب ایجاد بیماری شود (۱۱). در بره‌ها علایم شکل فوق حاد بیماری را معمولاً بیشتر می‌توان مشاهده کرد. عمده‌ترین علایم این بیماری مرگ ناگهانی گوسفند پس از دوازده ساعت بعد از واضح شدن علایم بیماری است. این علایم شامل هیجان و تشنج، از دست دادن اشتها، اسهال شدید یعنی اسهال آبکی با و یا بدون خون، درد ناحیه شکمی به‌واسطه لگد زدن به شکم و قوس کردن ناحیه کمر مشخص می‌گردد. مرگ ناگهانی دقایقی پس از این‌که بره و یا بزغاله علایم اختلالات سیستم عصبی مرکزی را از خود نشان

[۱۹۱] Yellow lamb disease

داد، اتفاق میافتد. در بررسی پس از مرگ روده‌های بزرگ و کوچک مقدار زیاد از خونابه و لخته‌های فیبروزی و تعداد زیادی زخم‌های مخاطی (در غشای داخلی روده) مشاهده می‌شود (۱۰،۱۱).

مقاومت میکروبی زمانی واقع می‌شود که یک دارو توانایی خود را در مهار رشد باکتری‌ها به‌طور مؤثر از دست دهد. باکتری‌ها در موجودیت سطوح درمانی انتی بیوتیک‌ها "مقاوم" می‌شوند و به تکثیر خود ادامه می‌دهند. مقاومت میکروبی به دلیل وجود ساختمان جینتیکی خارج کروموزومی مانند پلازمیدها و ترانسپوزون‌ها رخ می‌دهد که می‌توانند از باکتری به باکتری دیگر در پروسه‌هایی بنام کانجوگیشن، ترانسدکشن و ترانسفورمیشن انتقال نمایند (۱۲).

مواد و روش‌کار

این تحقیق در سال ۱۴۰۲بالای گوسفندان موجود در نخاس کمپنی واقع در غرب شهر کابل به شکل انتخابی صورت گرفته است. در این تحقیق به تعداد ۲۰ نمونه از مواد غایطه گوسفندان بین سنین ۱- ۲ سال مبتلا به اسهال جمع آوری گردید. نمونه‌ها به‌صورت درست با در نظرداشت شرایط حفظ الصحه‌ی در تحت شرایط معقم به داخل تیوب‌های حاوی فاسفیت بفر سلاین[۱۹۲] اخذ گرید (۱۳). و جهت انجام کارهای لابراتواری شامل کشت نمونه، کلچر فرعی نمونه، رنگ‌آمیزی و آزمایش مقاومت میکروبی در لابراتوار باکتریولوژی، لابراتوارهای مرکزی ریاست صحت حیوانی واقع در دارالامان شهر کابل انتقال گردید.

کشت باکتریا

در ابتداء تمام نمونه‌های جمع آوری شده را به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا سایر باکتریایی سپروفایت از بین برود. برای کشت کلستریدیوم پرفرنجنس در مرحله اول از وسط تفریقی کلستریدیایی[۱۹۳] DRCM از کمپنی (Fluka™) استفاده به عمل آمد. همچنان به‌خاطر جلوگیری ار رشد باکتری‌های سپرفیتس[۱۹۴] از پولیمگزین-بی و پارافین معقم جهت ایجاد شرایط مایکروایروفیلیک در وسط استفاده گردید. که در ابتداء یک دسک از انتی‌بیوتیک متذکره را به داخل تیوب قرار داده به تعقیب آن یک گرام نمونه را به داخل تیوب دارای ۹ ملی لیتر وسط مایع DRCM افزود گردید و ۲۰ قطره پارافین جهت شرایط غیرهوازی نمودن وسط نیز علاوه گردید. وسط متذکره به مدت ۲۴ ساعت در انکوبیتور به حرارت ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گذاشته شد و در صورت عدم سیاه شدن وسط الی ۴۸ ساعت انکوبیت گردید. بعد از ختم دوره انکوبیشن تظاهر رنگ‌سیاه در وسط DRCM نمایانگر رشد احتمالی

[192] Phosphate Buffer Saline
[193] Differential Reinforced Clostridia Medium
[194] Saprophytes

کلستریدیوم پرفرنجنس تلقی گردیده. از این‌که سیاه شدن وسط متذکره توسط فلورای عادی روده حیوانات مانند کلستریدیوم بیفرمنتانس[۱۹۵] و کلستریدیوم سپورنجنس[۱۹۶] و همچنان یک تعداد سترپتوکوک‌ها نیز صورت می‌گیرد(۱۴)، لذا برای تثبیت و تجرید نهایی کلاستریدیوم پرفرنجنس کلچر فرعی نیز صورت گرفت.

کلچر فرعی نمونه‌ها به آگرخوندار

اطلاعات که در مورد خصوصیات کشت کلستریدیوم پرفرنجنس ارائه شده است نشان می‌دهند که این باکتری خاصیت همولایتک داشته و کالونی‌های آن در وسط آگرخوندار[۱۹۷]یک ساحه همولایز دوگانه[۱۹۸] را تشکل می‌دهند(۱۵)، که در ابتدا ساحه یاد شده کوچک بوده و با گذشت زمان ساحه نامنظم و وسیع می‌گردد. برای این‌که باکتری عامل را در وسط آگرخوندار کشت نمود، یک قطره مناسب از وسط مثبت DRCM توسط پیپیت معقم شیشه‌ی پاستور گرفته شد و به داخل پلیت علاوه گردید. به تعقیب آن، قطره مورد نظر توسط لوپ سیمی معقم به شکل کلچر زکزاک یا خطی کشت گردید. در مرحله بعدی جهت جلوگیری و یا کاهش رشد باکتری‌های گرام منفی به‌ویژه پروتیوس، یک کاغذ فلتر را در الکول ۱۰۰٪ آغوشته گردید و در سرپوش پلیت قرار داده شد. به‌گونه‌ی که فلتر حاوی الکول به وسط در تماس نباشند. ناگفته نباید گذاشت که به‌کارگیری فلتر آغوشته به الکول صرف در لابراتوار مرکزی تشخیص و تحقیق وترنری مروج بوده و کدام منبع دیگر استفاده آن را نه تأیید نموده و نه رد کرده است، پلیت‌های کلچر شده را در داخل جار غیرهوازی[۱۹۹] قرار داده و در ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت انکوبیت گردید. برای اطمینان بیشتر و تثبیت مورفولوژی باکتری متذکره از کالونی دبل زون همولایز سمیر ساخته شد و توسط رنگ‌آمیزی گرام رنگ‌آمیزی گردید.

رنگ‌آمیزی گرام

رنگ‌آمیزی گرام کمک می‌نماید تا در مورد شکل، اندازه‌ی مورفولوژی و واکنش گرام باکتری معلومات کسب کرده باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس نیز در نتیجه این رنگ‌آمیزی به صورت گرام مثبت، ضخیم یک دانه‌یی یا دو دانه‌یی ندرتاً زنجیری مشاهده می‌گردد. روی این ملحوظ جهت تهیه نمودن سمیر یک قطره آب مقطر توسط پیپت پاستور بالای سلاید شیشه‌ی علاوه گردید، توسط لوپ یک کالونی باکتری را گرفته با آب مقطر بالای سلاید مخلوط گردید. سلاید را از بالای شعله عبور و فکس گردید، بعداً

---

[195] Clostridium bifermentans
[196] Clostridium sporogenes
[197] Blood agar Oxoid™
[198] double zone hemolysis
[199] Anaerobic jar

توسط کیت گرام[۲۰۰] رنگ‌آمیزی گردید. نخست رنگ گرستال و ایلیت بالای سمیر به مدت یک دقیقه علاوه گردید، توسط آب مقطر شستوشو و دوباره رنگ آیودین را جهت تثبیت نمودن به مدت یک دقیقه علاوه گردید، دوباره سلاید را شستشو و به مدت ۳۰ ثانیه توسط الکول رنگ‌زدایی گردید و سلاید آب‌کش و رنگ سفرانین را به مدت یک دقیقه علاوه گردید و در نهایت سلاید در زیر مکروسکوپ به قوه x ۱۰۰ مشاهده گردید (۱۶). همچنان جهت دریافت مقاومت میکروبی آزمایش انتی‌بیوگرام صورت گرفت.

آزمایش انتی‌بیوگرام[۲۰۱]

یک روش معمول مورد استفاده برای دریافت حساسیت میکروبی در اکثریت لابراتوارهای میکروبیولوژی می‌باشد. یک دسک دارای اندازه‌های معین دوا بالای یک وسط جامد که در آن مایکروارگانیزم مشخص زرع گردیده قرار داده می‌شود که قطر ساحه نهی‌شده‌ی رشد باکتری بعد از ۲۴ ساعت انکوبیشن در اطراف دسک دوایی یک معیار تثبیت قدرت نهی‌کننده در برابر باکتری مورد آزمایش قبول می گردد. زون نهی‌شده‌ی اندازه‌شده با معیار مشخص مقایسه و با حداقل غلظت نهی‌کننده MIC[۲۰۲] رابطه می‌دهند. وسط معمول مورد استفاده برای حساسیت میکروبی عبارت از وسط مولرهنتون اگر[۲۰۳] است.

وسط مولرهنتون اگر را آماده و به پلیت‌ها علاوه گردید. به اندازه ۰,۵ ملی‌لیتر از نموده را گرفته بالای وسط علاوه و توسط سوب در تمام بخش‌های وسط پخش گردید، بعداً منتظر ماندیم تا کمی خشک شود، بعداً دسک‌های[۲۰۴] انتی‌بوتیک را توسط پنس و یا توزیع‌کننده‌ی اتومات دسک بالای وسط قرار دادیم و وسط را به شکل هوازی در حرارت ۳۵-۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبیت کردیم. پس از مدت متذکره نتایج را خوانده و به‌حیث حساس مقاوم و حساسیت متوسط با چارت ستندرد حساسیت مقایسه گردید (۱۶،۵).

تحلیل ارقام: تمام ارقام به‌دست آمده بعد از کشت، رنگ‌آمیزی و آزمایش مقاومت میکروبی به فایل اکسیل درج گردید و با استفاده از احصایه توصیفی (تعداد و فیصدی) مورد تحلیل و ارزیابی قرار گرفت.

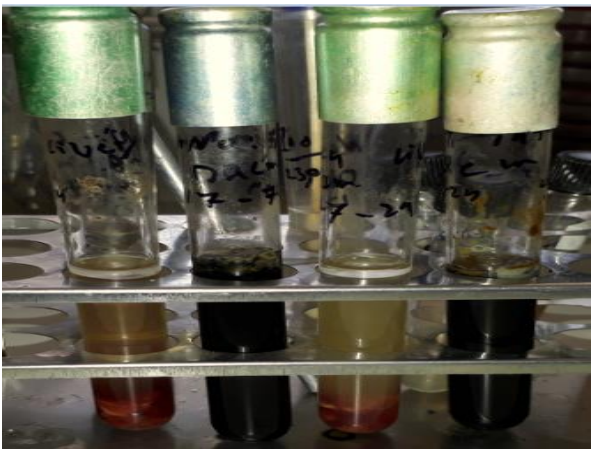
نتیجه و مناقشه

این تحقیق که بالای ۲۰ نمونه جمع‌آوری شده از مواد غایطه گوسفندان مبتلا به اسهال صورت گرفت. بعد از قرار دادن نمونه‌ها در حمام آبی و کشت نمودن در وسط مایع تفریقی DCRM تغییر رنگ وسط

---

200 BD BBL™ Gram Stain Kits
201 Antibiogiram test
202 Minimum inhibitory concentration
203 Mueller Hinton Agar Oxoid™
204 Oxoid™ Susceptibility discs

متذکره به رنگ سیاه نشان‌دهنده‌ی احتمالی کلستریدیوم پرفرنجنس است که به تعداد ۷ (۳۵٪) از نمونه‌ها مثبت دریافت گردید(شکل۱)، به این اساس میزان شیوع در بین گوسفندان ۳۵ ٪ می‌باشد.

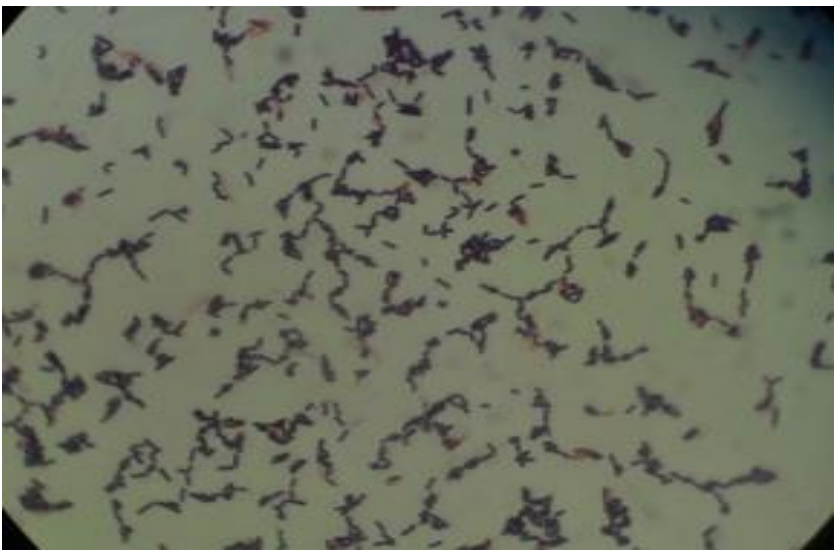


شکل۱: تغییر رنگ وسط تفریقی DCRM به رنگ سیاه نشان‌دهنده‌ی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس می‌باشد

بعداً تمام ۷ نمونه‌های مثبت متذکره به‌خاطر موجودیت کلستریدیوم پرفرنجنس به وسط جامد آگر خوندار جهت دریافت همولایز دبل زون توسط لوب سب کلچر گردید(شکل).

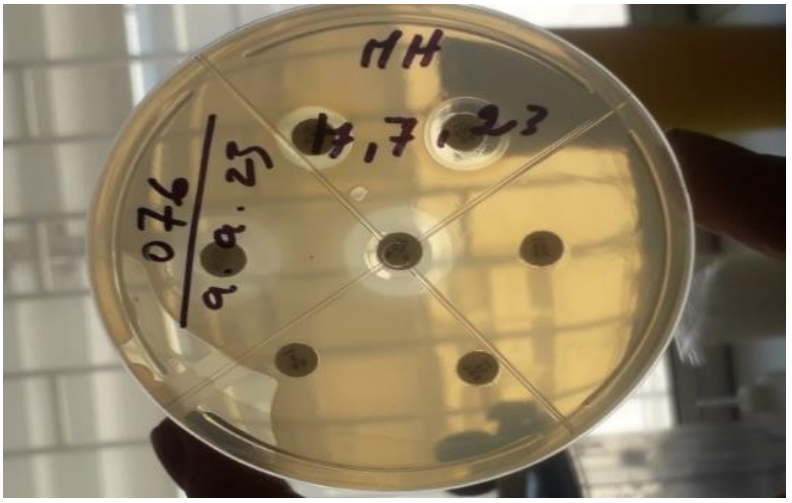
شکل۲: کشت نمونه مثبت در وسط آگر خوندار و تولید کالونی‌های با دبل همولایز نشان‌دهنده‌ی کلستریدیوم پرفرنجنس می‌باشد

علاوه برآن، از کالونی‌های که در آگر خوندار رشد نموده جهت دریافت مشخصه مورفولوژیک باکتری متذکره یک کالونی را برداشته و از آن سمیر آماده گردید (شکل).



شکل۳: نشان‌دهنده‌ی باکتری گرام مثبت، چوبک‌مانند کلستریدیوم پرفرنجنس

در نهایت، بعد از تثبیت باکتری‌کلستریدوم پرفرنجنس در نمونه‌های جمع‌آوری شده بالای نمونه‌های مثبت ۷ (۳۵٪)آزمایش انتی‌بیوگرام انجام گردید (شکل). هم‌چنان دسک‌های انتی‌بیوتیک که جهت آزمایش حساسیت میکروبی در جدول توضیح گردید.

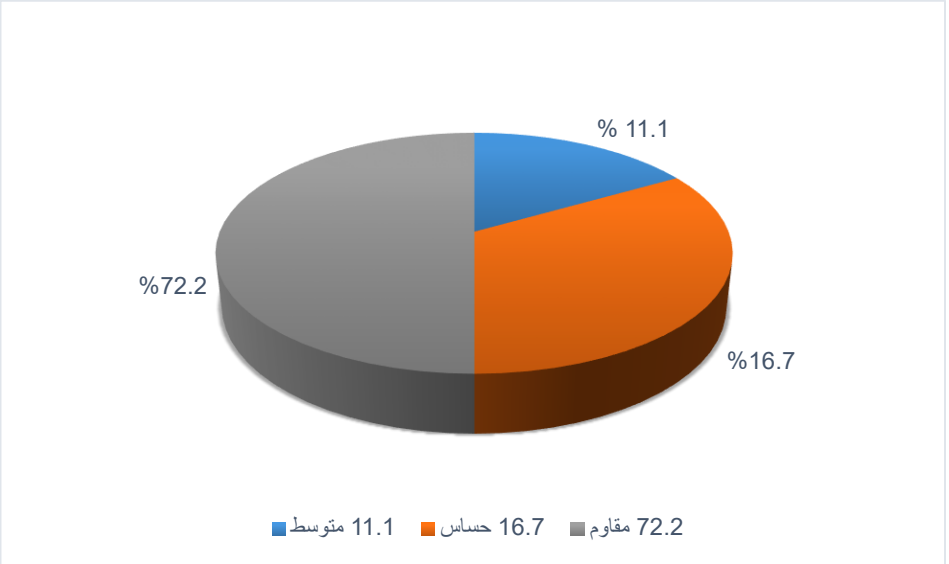


شکل ۴: نشان‌دهنده‌ی آزمایش حساسیت میکروبی کلستریدیوم پرفرنجنس

جدول۲: تعداد دسک‌های انتی‌بیوتک که در آزمایش انتی‌بیوگرام استفاده گردید

تعداد	نوع انتی‌بیوتیک
۱	آمپسیلین ۱۰ ملی‌گرام
۲	سپروفلاکسین ۵ ملی‌گرام
۳	کوتریمکسازول ۲۵ ملی‌گرام
۴	جنتومایسین ۱۰ ملی‌گرام
۵	نالیدیکسیک اسید ۳۰ ملی‌گرام
٦	اوگزاسیلین ۱ ملی‌گرام
۷	پینیسلین جی
۸	تتراسکلین ۳۰ ملی‌گرام
۹	وانکومایسین ۳۰ ملی‌گرام
۱۰	پولی‌مگزین ۳۰۰ ملی‌گرام
۱۱	آموکسیسیلین ۳۰ ملی‌گرام
۱۲	کلیندومایسین ۲ ملی‌گرام
۱۳	کناماسین ۳۰ ملی‌گرام
۱۴	نورفلاکسین ۱۰ ملی‌گرام
۱۵	سفوکسین ۱۵ ملی‌گرام
۱٦	ازیترومایسین ۱۵ ملی‌گرام
۱۷	کولسیتن ۱۰ ملی‌گرام
۱۸	نیتروفورانتین ۳۰۰ ملی‌گرام

به‌طور کلی از مجموعه ۱۸ انتی‌بیوتیک که در جدول ۲ ذکر شده است، در این تحقیق بالای ۷ نمونه مثبت کلستریدیوم پرفرنجنس مورد آزمایش قرار گرفت. باکتری متذکره در برابر۱۳ انتی‌بیوتیک مانند (آموکسیسلین، سیپروفلاکسین، کلیندومایسین، کوتریمکسازیول، جینتومایسین، نالیدیکسیک اسید، نیتروفوراتوین، نورفلاکسین، اوکسیسیلن، پینیسیلین جی، تتراسکلین و وانکومایسین) مقاوم دریافت گردید در حالی‌که در برابر ۳ انتی‌بیوتک مانند (کولسین، پولی‌مکزین و ازیترومایسین) حساس و اما در برابر ۲ انتی‌بیوتک مانند (سیپروفلاکسین و کنامایسین) حساسیت متوسط از خود شان نشان دادند، نتیجه آزمایش مقامت میکروبی بالای نمونه‌های مثبت به کلستریدیوم پرفرنجنس در شکل توضیح گردیده است که باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در برابر۱۸ انتی‌بیوتیک‌های به‌کار رفته در آزمایش متذکره در برابر ۷۲,۲ ٪ شان مقاوم شده اند؛ اما در برابر ۱٦,۷ ٪ شان حساس ولی در برابر ۱۱,۱ ٪ شان حساسیت متوسط از خود نشان داد.



شکل۵: نشان‌دهنده‌ی فیصدی مقاومت، حساسیت و حساسیت متوسط در برابر انواع مختلف انتی‌بیوتیک‌ها

بنابراین، تحقیق را که الصاب و همکاران در سال (۲۰۲۱) بالای ۹۳ نمونه سوب[۲۰۵] ریکتوم و روده گوسفندان در عربستان سعودی انجام داد با استفاده از کلچر، رنگ‌آمیزی و آزمایش مالیکولی PCR[۲۰۶] ۱۴(۱۵ ٪) از نمونه‌ها را مثبت به کلستروديوم پرفرنجنس دریافت نمودند(۳). که تا حدود با این تحقیق در هم‌خوانی قرار دارد. هم‌چنان تحقیق را که محمد و همکاران در سال (۲۰۲۳) بالای ۱۴۰ نمونه که ۸۰ نمونه آن از گوسفندان و ۶۰ نمونه آن از بزها در مصر انجام داد که ۱۶(۱۷,۸ ٪) نمونه از گوسفندان را مثبت به کلستریدیوم پرفرنجنس دریافت نمودند. هم‌چنان با انجام آزمایش مقاومت میکروبی دریافت نمودند که کلستریدیوم پرفرنجنس در برابر تتراسکلین، اوکسی‌تتراسکلین، پنسیلین، وانکوماسین، اوگزاسیلین و میترونیدازول مقاوم اما در برابر کولستین، آموکسیسلین و لینکومایسن حساسیت متوسط ولی در برابر سپروفلاکسین و لیوفلوکزاسین حساس اند (۱۸) که با این تحقیق در هم‌خوانی قرار دارد.

علاوه براین، تحقیق را که حیاتی و همکاران در سال (۲۰۲۰) در ایران بالای ۴۵۰ نمونه مواد غایطه گاو، گوسفند و بز انجام داد و ۳۸ (۲۵,۵۰ ٪) نمونه از ۱۴۹ نمونه گوسفندان را مثبت دریافت نمودند(۱۹).

تحقیق را که محی‌الدین و همکاران در سال (۲۰۲۰) بالای ۳۹۹ نمونه از گوسفندان و بزهای سالم و بیمار در پاکستان انجام داد ۱۸۴ (۴۱,۱ ٪) نمونه را به کلستریدیوم پرفرنجنس مثبت دریافت نمودند و هم‌چنان با انجام آزمایش مقاومت میکروبی دریافت نمودند که باکتری متذکره در برابر پینسیلین جی، ریفامپین

[205] swab
[206] Polymerase Chine Reaction

و سیفتوفور حساس اما در برابر تتراسیکلین و نیومایسین مقاوم اند (۷). که با این تحقیق در هم‌خوانی کامل قرار ندارد.

هم‌چنان تحیقیق را که رحمن و همکاران در سال (۲۰۱۳) بالای ۲۰ نمونه سوب ریکتوم در بره‌ها انجام داد ۵ (۲۵ ٪) نمونه را مثبت به کلستریدیوم پرفرنجنس دریافت نمود و با انجام آزمایش مقاومت میکروبی دریافت که کلستریدیوم پرفرنجنس ۱۰۰ ٪ مقاوم به سترپتومایسین، کلورامفنیکول و جینتومایسین بوده؛ اما ۱۰۰ ٪ حساس به سپروفلاکسین و لیوفلوکزاسین می‌باشد(۲۰).

بنا بر این، با استفاده از امکانات تشخیصی خیلی ساده موفق به تجرید ۷ نمونه مثبت گردیدیم، نتایج این تحقیق موضوع نگران کننده مقاومت انتی‌بیوتیکی در این باکتری خاص را روشن ساخته است. ارقام ارائه شده در شکل به وضوح نشان می‌دهد که کلستریدیوم پرفرنجنس تجرید شده از گوسفندان نخاس در شهر کابل درجه بالایی از مقاومت را در برابر طیف وسیعی از انتی بیوتیک‌ها نشان داده‌اند، به طوری که ۷۲,۲ درصد از انتی بیوتیک‌های آزمایش شده نتوانسته‌اند اثر مورد نظر خود را اعمال کنند. این یافته‌ها بر نیاز فوری به افزایش هوشیاری و تحقیقات بیشتر در مورد میکانیزم های در ادامه این مقاومت تاکید می‌کند. این نمونه مقاومت دلیل مهمی برای نگرانی است و نیاز به بررسی دقیق در ساحه وترنری و صحت عامه در سراسر کشور دارد. قابل ذکر است که این تحقیق تنها در یک مارکیت فروش حیوانات صورت گرفته است، بنابر این، برای دست یابی به نتایج دقیق‌تر نیاز است تا بررسی در سطح ولایات و یا کشور انجام شود تا بتوانیم میزان مقامت باکتری را در برابر انتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در ساحه وترنری را دریافت نمایم. همچنان باید یادآور شوم که بنابر نبود کیت نتوانسیتم آزمایش سیرولوژیک ELISA[۲۰۷] و آزمایش مالیکولی PCR را که نتایج آن معتبر اند انجام دهم.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس از گوسفندان مبتلا به اسهال تجرید و شناسایی گردید. با انجام آزمایش مقاومت میکروبی دریافت گردید که باکتری متذکره در برابر بیشتر انتی‌بیوتیک‌ها مقاوم گردیده است. ممکن این بررسی توصیه نماید که ازیترومایسین، کولستین، و پولی مگزین و همچنان سپروفلاکسین کنامایسین (انتی‌بیوتیک دارای ساحه تاثیر وسیع) به دوزهای مناسب می‌توانند اسهال ناشی از کلستریدوم پرفرنجنس را در گوسفندان تداوی نمایند. بطور کلی با انجام این تحقیق نگرانی عمده مقاومت میکروبی دریافت گردید که نشان دهنده استفاده بیش از حد و بی رویه انتی‌بیوتیک در ساحه وترنری بوده که در نهایت مشکلات عمده را دامن گیر صحت عامه می‌سازد.

---

[207] Enzyme-linked immunosorbent assay

منابع

۱. صمدی، ا.ا. اساسات باکتریولوژی و ایمیونولوژی. نشریه پرند. ۱۳۹۷. صص ۲۴۰-۲۴۸.

2. Nazki S, Wani SA, Parveen R, Ahangar SA, Kashoo ZA, Hamid S, et al. Isolation, molecular characterization and prevalence of Clostridium perfringens in sheep and goats of Kashmir Himalayas, India. Vol. 10, Veterinary World. 2017. p. 1501–7.
3. Pilehchian, Langroudi. R, Aghaei Pour. K, Shamsara. M, Jabbari, A.R H. Fusion of Clostridium perfringens type D and B epsilon and beta toxin genes and it's cloning in E. coli. Razi Vaccine Serum Res Inst Full. 2011;66(1):1–10.
4. Alsaab F, Wahdan A, Saeed EMA. Phenotypic detection and genotyping of Clostridium perfringens associated with enterotoxemia in sheep in the Qassim Region of Saudi Arabia. Vol. 14, Veterinary World. 2021. p. 578–84.
5. Grenda T, Jarosz A, Sapała M, Grenda A, Patyra E, Kwiatek K. Clostridium perfringens—Opportunistic Foodborne Pathogen, Its Diversity and Epidemiological Significance. Vol. 12, Pathogens. 2023; 12(6):768.
6. Mohiuddin, Mudassar. Iqbal, Zahid. Siddique, Abubakar, Liao, Shenquan. Salamat, Muhannad Khalid Farooq. Qi, Nanshan. Din, Ayesha Mohiud and Sun M. Prevalence, Genotypic and Phenotypic Characterization and Antibiotic Resistance Profile of Clostridium perfringens Type A and D Isolated from Feces of Sheep (Ovis aries) and Goats (Capra hircus) in Punjab, Pakistan. Toxins (Basel). 2020;12(10):657.
7. McClane BA. Clostridium perfringens. Encycl Toxicol Third Ed. 2014;(May):987–8.
8. Mohiuddin M, Iqbal Z, Siddique A, Liao S, Khalid M, Salamat F, et al. Characterization and Antibiotic Resistance Profile of Clostridium perfringens Type A and D Isolated from. Toxins (Basel). 2020;12(10):657.
9. Santana, Jordana Almeida. Ferreira. Ana Carolina de Andrade Ferreira SM de CC de. Isolation and genotyping of Clostridium perfringens from goats in Minas Gerais, Brazil. Ciência Rural. 2018;
10. Uzal FA. Diagnosis of Clostridium perfringens intestinal infections in sheep and goats. Vol. 10, Anaerobe. 2004. p. 135–43.
11. Uzal, Francisco A. Giannitti, Federico. Finnie, John W and Garcia JP. Diseases Produced by Clostridium perfringens Type D. Wiley Blackwell Ames, IA, USA. 2016;152–72.
12. Hussain, K. Ijaz, M. Durrani, A.Z. Anjum, A.A. Nasir, A.A. Farooqi, S.H. Aqib, A.I and Ahmad AS. Bacterial count and predisposing factors of Clostridium perfringens (targeting CPA gene) infection along with antimicrobial sensitivity in diarrheic sheep in Pakistan Hussain,. Trop Biomed. 2018;(35):2.
13. Perović S, Veinović G, Antić Stanković J. A review on antibiotic resistance: Origin and mechanisms of bacterial resistance as biological phenomenon. Genetika. 2018;50(3):1123–35.
14. Rahimoon MM. Prevalence of enterotoxemia and antibiogram of Clostridium perfringens isolated from diarrheic goat in the vicinity of district Tharparkar, Sindh, Pakistan. Pure Appl Biol. 2021;10(1):408–15.
15. Diagnostic A. Product Specification Sheet. 2005;1(800):110906.

16. Habib Wani A, Hussain I, Maqbool R, Dar PS, India S, Ganaie MY, et al. Isolation, identification and molecular characterization of Clostridium perfringens from poultry in Isolation, identification and molecular characterization of Clostridium perfringens from poultry in Kashmir valley, India. J Entomol Zool Stud [Internet]. 2017;5(5):409–14. Available from:
17. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information [Internet]. American Society For Microbiology. 2012. p. 1–13. Available from: https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro.
18. Mohamed, Hams M.A. Elfeky, Manar M.H. Al-Azeem, M. W. Abd and Wasel FA. Molecular characterization of Clostridium perfringens in small ruminants. SVU-IJVS. 2023;6(2).
19. Hayati, Masoumeh. Shamseddini, Mehrdad. Tahamtan, Yahya. Sadeghzadeh, Safar. Manavian, Mohsen and Nikoo D. Isolation and Toxin Typing of Clostridium Perfringens From Sheep, Goats, and Cattle in Fars Province, Iran. Int J Enteric Pathog. 2020;8(3):89–93.
20. Rahaman, M.S. Akter, M.R. Abdullah, M. Sayed Khan, M.A. Jahan, M.S. Ziaul Haque, A.K.M. Isolation, identification and characterization of Clostridium perfringens from lamb dysentery in Dinajpur district of Bangladesh. Sci J Microbiol. 2013;2(4):83–8.