تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* از موارد حاد بیماری آنتریت نکروتیک

حسین نیک‌پیران[1*]، بهرام شجاع‌دوست[2] و سیّد مصطفی پیغمبری[2]

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
*. نویسنده مسئول مکاتبات: nikpiran20@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۸۷/۲/۱، پذیرش نهایی: ۸۷/٤/۲۷)

چکیده

در مطالعه حاضر پس از جداسازی ٤۰ جدایه کلستریدیوم پرفرینجنس از گله‌های گوشتی مبتلا، با انجام آزمایش آنتی‌بیوگرام مشخص گردید که این ٤۰ جدایه از موارد بالینی، ۳۹ الگوی مقاومت دارویی را نشان دادند که ۹۵٪ جدایه‌ها در ۳۸ الگوی مقاومت داروئی مختلف (یک جدایه در هر الگو) و تنها ۵٪ جدایه‌ها در یک الگوی مقاومت داروئی (۲ جدایه در الگو) قرار داشتند. تمامی ٤۰ جدایه کلستریدیوم پرفرینجنس در این بررسی به کلرامفنیکل، ونکومایسین و سولفامتوکسازول+ تری‌متوپریم، مقاومتی از صفر تا ۱۷/۵٪ نشان دادند، در حالی‌که ضد باکتری‌های تتراسایکلین، لینکومایسین و نئومایسین سولفات مقاومت داروئی بالا از ۸۰ تا ۸۷/۵٪ را داشتند. در این آزمایش همچنین یک جدایه مقاومت چندگانه‌ای به بیش از ۱٤ ترکیب ضدباکتریایی نشان داد.

مجله علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸٦، دوره ۱، شماره ٤، ۲۸٦-۲۷۷.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم پرفرینجنس، الگوی مقاومت دارویی، طیور گوشتی، آنتریت نکروتیک

مقدمه

بیماری آنتریت نکروتیک، یکی از بیماری‌های باکتریائی در روده طیور محسوب می‌شود که توسط باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A یا C ایجاد می‌گردد. در کشورهایی مانند ایران که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد و کوکسیدیواستات‌های یونوفوره که بر باکتری‌های گرم مثبت اثر دارند متداول می‌باشد، وقوع بیماری دور از انتظار نیست. با این‌حال بروز بالینی این بیماری به‌خصوص در گله‌های گوشتی بسیار محدود می‌باشد. در مطالعه حاضر ٤۰ جدایه کلستریدیوم پرفرینجنس که از موارد بالینی بیماری جداسازی و خصوصیات میکروبی و بیوشیمیایی آن‌ها مشخص گردیده بود، الگوی مقاومت دارویی آن‌ها تعیین گردید.

مواد و روش کار

جداسازی و شناسایی باکتری

برای جداسازی باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* از لاشه طیور گوشتی مبتلا، ابتدا سطح سروزی روده لاشه‌های مبتلا توسط تیغه اسپاتول داغ استریل گردید. سپس موضع به‌وسیله بیستوری استریل برش داده شد و توسط یک لوپ استریل

مخاط روده تخریش و پس از تهیّه گسترش میکروبی و انجام رنگ‌آمیزی گرم زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. شناسائی باکتری بر اساس روش‌های تشریح شده توسط Summanen و همکاران در سال ۱۹۹۳، Quinn و همکاران در سال ۱۹۹٤ و Miller و همکاران در سال ۱۹۹۸ صورت پذیرفت(۷، ۹ و ۱۰). در صورت مشاهده باسیل‌های گرم مثبت حاوی اسپور، تشخیص احتمالی بر مبنای *کلستریدیوم پرفرینجنس* قرار می‌گرفت. برای جداسازی کلنی خالص *کلستریدیوم پرفرینجنس* از نمونه‌هائی که در رنگ‌آمیزی گرم مثبت بودند، بر روی پلیت آگار خون‌دار کشت خطی انجام شد (تمامی مراحل کشت در زیر هود آزمایشگاه و در مجاورت شعله انجام گردید). سپس پلیت‌های کشت شده به‌صورت وارونه در داخل جار بی‌هوازی (Anaerobic Jar, Merck, Germany) قرار داده شدند.

سپس گاز پک A (Anaerocult A, Merck) در داخل جار بی‌هوازی قرار گرفته و پس از بستن درب جار بی‌هوازی حاوی پلیت‌های آگار خون‌دار کشت شده این جارها در انکوباتور در درجه حرارت ۳۷ درجه به‌مدت ٤٨ ساعت قرار داده شدند. برای تأیید شرائط بی‌هوازی از استریپ‌های اندیکاتور (Anaerotest, Merck) در هر جار استفاده شد.

بعد از گذشت زمان فوق‌الذکر، درب جار بی‌هوازی باز شده و پلیت‌های آگار خون‌دار کشت شده در زیر هود، در مجاورت شعله چراغ مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده کلنی‌های بزرگ صاف و گرد با قطر ۲ تا ٤ میلی‌متر با همولیز دوگانه (همولیز کامل در ناحیه داخلی و همولیز ناقص در ناحیه بیرونی) احتمال حضور *کلستریدیوم پرفرینجنس* را مطرح نمود. تعدادی از این کلنی‌ها انتخاب و پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند تا مورفولوژی مورد انتظار مشاهده شود.

برای تأیید تشخیص از محیط‌های متعددی استفاده شد. نمونه‌های احتمالاً مثبت به‌صورت خطی بر روی پلیت‌های آگار زرده تخم‌مرغ (Merck) کشت داده شدند. پلیت‌های آگار زرده تخم‌مرغ کشت شده به‌مدت ٤٨ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* لسیتیناز تولید می‌کند که به‌صورت وجود کدورت و سفیدی در محیط اطراف کلنی باکتری که دلیل بر فعالیت لسیتیناز باکتری است، مشخص می‌شود.

آزمایش بعدی، تست برای عدم تولید لیپاز بود که روی محیط کشت آگار زرده تخم‌مرغ صورت گرفت. از آنجائی‌که این باکتری لیپاز تولید نمی‌کند در محیط آگار زرده تخم مرغ واکنش مربوط به لیپاز یعنی تولید هاله در اطراف کلنی باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* به‌وجود نمی‌آید.

آزمایش دیگری که بر روی نمونه‌ها انجام شد آزمایش کمپ-معکوس (Reverse-CAMP test) بود. باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A و باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه بتاهمولیتیک* با یکدیگر الگوی سنیرژیستیک همولیتیک کمانی شکل تیپیک روی آگار خون‌دار ایجاد می‌کنند. برای این منظور ابتدا باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* احتمالی را به‌صورت یک خط روی محیط آگار خون‌دار کشت داده و سپس *استرپتوکوکوس آگالاکتیه بتاهمولیتیک* به‌صورت یک خط عمود بر خط کشت نمونه مشکوک کشت داده شد، به‌طوری‌که با هم تلاقی نداشته باشند (با چند میلی‌متر فاصله). پلیت‌ها به‌مدت ٢٤-٤٨ ساعت انکوبه شدند. در موارد مثبت، همولیزهای کمانی شکل مشاهده شدند.

آزمایش بعدی، آزمایش اوره‌آز بود. برای این منظور محیط استریل اوره تهیّه شده و نمونه‌ها در آن کشت داده شدند و در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت انکوبه گردیدند. *کلستریدیوم پرفرینجنس* اوره آز تولید نمی‌کند لذا تغییر رنگ مشاهده نمی‌شود. آزمایش حرکت نیز در مورد نمونه‌ها انجام شد. برای این منظور باکتری در لوله‌های حاوی محیط اوره کشت شد که در صورت بروز کدورت و تولید گاز CO_2، باکتری متحرک تلقی گردید. لازم به‌ذکر است

که باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* فاقد حرکت می‌باشد. تست ایندول نیز بر روی نمونه‌ها انجام شد. باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* ایندول تولید نمی‌نماید.

برای تأیید نهایی، نمونه‌های به‌دست آمده که در آزمایش‌های قبلی مثبت بودند (از نظر *کلستریدیوم پرفرینجنس*) بر روی محیط TSN (Tryptone Sulfite Neomycin agar) آگار (Merck) که محیط اختصاصی *کلستریدیوم پرفرینجنس* می‌باشد کشت داده شدند.

پلیت‌های کشت داده شده در شرایط بی‌هوازی به‌مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. بعد از طی مدت زمان مذکور در صورت وجود نتیجه مثبت کلنی‌هائی با هسته مرکزی تیره رنگ مشاهده شدند که بیان‌گر حضور باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* بود.

تعیین الگوی مقاومت داروئی جدایه‌ها

برای تعیین حساسیت ٤۰ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس* نسبت به داروهای ضدباکتریایی یک روشی کیفی[1]، آزمایش حساسیت باکتریائی[2] به‌کار گرفته شد. روش کیفی مورد استفاده، آزمایش دیسک دیفوزیون به‌روش استاندارد Kirby-Bauer بود (۸). محیط کشت انتخابی در این روش Mueller- Hinton (Merck) است که رشد پرگنه‌ها را به‌صورت انفرادی و در کنار هم به‌طور رضایت‌بخشی فراهم می‌کند. بیست عامل ضدباکتریایی مورد آزمایش و غلظت بالقوه آن‌ها (بر حسب میکروگرم) عبارت بودند از:

تایلوزین(۳۰)، دیفلوکساسین(۱۰)، اریترومایسین(۱۰)، تتراسایکلین(۳۰)، سولفامتوکسازول+تری‌متوپریم(۲۳,۷۵/۱,۲۵)، افلوکسازین(۵)، لینکومایسین، نورفلوکساسین(۱۰)، ونکومایسین(۳۰)، انروفلوکساسین(۵)، لینکوسپکتین(۱۵/۲۰۰)، آمپی‌سیلین(۱۰)، پنی‌سیلین(۱۰)، کلستین(۱۰)، کلرامفنیکل(۳۰)، نئومایسین(۳۰) که همگی از شرکت پادتن طب (ایران) تهیّه شده است.

آزمایش برای هر یک از ٤۰ جدایه به شرح ذیل انجام شد:

ابتدا کلستریدیوم پرفرینجنس برداشت شده از محیط ذخیره BHB (Brain Heart infusion Broth) (آبگوشت مغز و قلب، Merck) روی محیط آگار خون‌دار کشت خطی داده شده و به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه گردید. سپس ٤ تا ۵ کلنی تک *کلستریدیوم پرفرینجنس* از محیط آگار خون‌دار برداشت شده و به یک لوله آزمایش درب‌دار حاوی ٤ تا ۵ سانتی‌مترمکعب محیط BHB انتقال داده شد. محیط تلقیح شده به‌مدت ۲ تا ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی تا مشاهده یک کدورت واضح و قابل قبول و منطبق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند انکوبه گردید.

سپس یک سواپ استریل به‌درون این سوسپانسیون باکتریایی وارد و مایع اضافی سواپ با فشار و چرخاندن به جداره داخلی لوله حاوی سوسپانسیون باکتریایی گرفته شد و بعد سواپ به‌صورت خطی و بدون فاصله بین خطوط کشت بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار (ضخامت محیط کشت فوق ٤ میلی‌متر بود) که ۲۰ دقیقه قبل از استفاده از یخچال خارج گردیده بود، کشت داده شد.

به‌منظور تلقیح یکنواخت، کشت خطی سه مرتبه انجام شد. بدین نحو که هر مرتبه پلیت حاوی محیط کشت به‌میزان ٦۰ درجه نسبت به دفعه قبل چرخانیده شده و مجدداً سواپ بر روی آن به‌صورت خطی کشیده شد.

در نهایت سر سواپ به لبه داخلی پلیت و در تماس با سطح محیط کشت چسبانده و یک دور کامل چرخانده شد. پلیت‌های تلقیح شده به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه به همان حال باقی ماندند تا رطوبت اضافی قبل از گذاشتن دیسک‌های آنتی‌بیوگرام توسط آگار جذب شود.

1 - Qualitative method
2 - Antibacterial susceptibility test

سپس دیسک‌های مورد آزمایش که یک ساعت قبل، به‌منظور رسیدن به درجه حرارت آزمایشگاه از یخچال خارج شده بودند توسط پنس استریل بر روی سطح محیط مولرهینتون تلقیح شده قرار داده شدند.

به‌منظور رعایت فاصله بین دیسک‌ها بر روی محیط کشت به‌میزان ٢٤ میلی‌متر از یکدیگر و ١٥ میلی‌متر از جدار پلیت فقط ٦ دیسک بر روی یک پلیت ٩٠ میلی‌متری گذاشته شد.

ظرف مدت ١٥ دقیقه پس از دیسک‌گذاری، پلیت‌ها جمع‌آوری شده و در وضعیت وارونه و به‌مدت ١٦ تا ١٨ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند.

بعد از این مدت برای قرائت نتیجه آزمایش با استفاده از چشم غیرمسلح و در حضور نور متمرکز، قطر هاله ممانعت از رشد هر ضدباکتریایی بر حسب میلی‌متر توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد و با مقایسه با جداول تفسیر قطر هاله ممانعت بر اساس حساس و مقاوم طبقه‌بندی شدند.

نتایج

تمامی ٤٠ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس* در این بررسی نسبت به کلرامفنیکل و سولفامتوکسازول+ تری‌متوپریم و ونکومایسین دارای حساسیتی از ٨٢/٥ درصد تا ٩٠ درصد بودند در حالی‌که به ترکیبات ضدباکتریایی تتراسایکلین، لینکومایسین و نئومایسین سولفات مقاومت دارویی بالا (از ٨٠ درصد تا ٨٧/٥ درصد) را نشان دادند (جدول ١).

همچنین مشخص گردید که ١٠٠ درصد جدایه‌ها به بیش از ١ ترکیب ضدباکتریایی مقاومت نشان می‌دهند (جدول ٢) و تنها ٢/٥ درصد جدایه‌ها مقاومت چندگانه به بیش از ١٤ ترکیب ضدباکتریایی (تنها یک جدایه) را نشان می‌دهند. مطالعه نسبت به ٢٠ ترکیب آنتی‌بیوتیک مصرفی مؤید وجود ٣٩ الگوی مقاومت دارویی است.

جدول ٣ نشان می‌دهد که ٩٥٪ جدایه‌ها در ٣٨ الگوی مقاومت دارویی (یک جدایه در هر الگو) و تنها ٥ درصد جدایه‌ها در یک الگوی مقاومت دارویی (٢ جدایه در الگوی شماره ١٥) قرار دارند.

جدول۱- درصد مقاومت داروئی ٤٠ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس* از موارد آنتریت نکروتیک مرغ گوشتی نسبت به ۲۰ ترکیب ضدباکتریایی

ترکیبات ضد باکتریایی	٪ جدایه‌های مقاوم	٪ جدایه‌های نیمه‌حساس	٪ جدایه‌های حساس
ونکومایسین	۱۰	صفر	۹۰
اریترومایسین	۳۰	٦۷/۵	۲/۵
تایلوزین	۲۷/۵	٤۷/۵	۲۵
آموکسی‌سیلین	۳۰	صفر	۷۰
آمپی‌سیلین	۲۷/۵	۳۲/۵	٤۰
پنی‌سیلین	۲۰	صفر	۸۰
جنتامایسین	۵۲/۵	صفر	٤۷/۵
فلومکوئین	٤۰	۷/۵	۵۲/۵
کلستین	٤۰	٤۷/۵	۱۲/۵
تتراسایکلین	۸۰	۱۲/۵	۷/۵
کلرامفنیکل	صفر	۱۷/۵	۸۲/۵
لینکومایسین	۸۰	صفر	۲۰
لینکوسپکتین	۳۲/۵	۱۰	۵۷/۵
افلوکساسین	٤۰	۱۰	۵۰
نورفلوکساسین	۲۲/۵	۱۰	٦۷/۵
انروفلوکساسین	۳۲/۵	۳۰	۳۷/۵
نئومایسین سولفات	۸۷/۵	۷/۵	۵
اسید نالیدیکسیک	۵۲/۵	۱۲/۵	۳۵
دیفلوکساسین	۲۷/۵	۲/۵	۷۰
سولفامتوکسازول+ تری‌متوپریم	۱۷/۵	صفر	۸۲/۵

جدول۲- مقاومت چندگانه جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* از موارد مزرعه‌ای آنتریت نکروتیک نسبت به ترکیبات ضدباکتریایی از مجموع ۲۰ ترکیب

درصد جدایه‌های مقاوم	تعداد ترکیبات ضدباکتریایی
۱۰۰	۱
۱۰۰	۱<
۹۵	۲<
۹۲/۵	۳<
۸۰	٤<
٦۲/۵	۵<
٤۷/۵	٦<
٤۲/۵	۷<
٤۰	۸<
۲۷/۵	۹<
۲۲/۵	۱۰<
۱۲/۵	۱۱<
۱۰	۱۲<
۵	۱۳<
۲/۵	۱٤<
صفر	۱۵<

جدول۳- الگوی مقاومت دارویی ٤٠ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس* از موارد بالینی آنتریت نکروتیک مرغ گوشتی نسبت به ۲۰ ترکیب ضدباکتریایی

شماره الگو	شماره جدایه	تعداد ایزوله	مقاوم به
۱	۱۰	۱	SXT ،NA ،Neo ،Col ،Flu
۲	۱۲	۱	STx، LP، NA ،Neo ،Tet ،Er ،Tv ،Pen ،Amx ،Amp
۳	۳۷	۱	NA ،Neo ،Lin ،Tet ،Col ،Flu ،Er
٤	۳۸	۱	Ofx ،NA ،Neo ،Lin ،Tet ،Col ،Flu ،Er
٥	٤۰	۱	Ofx ،NA ،Neo ،Lin ،Tet ،Col ،Col ،Flu ،Fr ،Ty
٦	٦۰	۱	LP ،Nfx ،Neo ،Lin ،Tet،Gen ،Er ،Tv ،Pen ،Amx ،Amp
۷	٦۱	۱	LP،NA ،Neo ،Tet،Gen ،Er ،Ty ،Pen ،Amx ،Amp
۸	٦٥	۱	SXT ،Ofx، LP ،NOR ،NA ،Neo ،Lin ،Gen،Vc ،Er ،Tv ،Pen ،Amx ،Amp
۹	٦۷	۱	Neo ،Lin ،Tet ،Col ،Gen
۱۰	۷۱	۱	Lin ،Tet
۱۱	۷۳	۱	OfX ،NfX ،Nor ،NA ،Neo ،Dfx ،Tet، cel ،Flu
۱۲	۷۸	۱	Neo ،Lin، Col ،Gen
۱۳	۸۳	۱	،Lin ،Tet ،Col ،Flu ،Gen ،Ty ،Pen، Amx ،Amp
۱٤	۹۰	۱	LP ،Vc
۱٥	۹۱، ۱۱۱	۲	Neo، Lin ،Tet ،Col
۱٦	۹۳	۱	Lin ،Tet ،Col
۱۷	۹٤	۱	Neo ،Lin ،Tet ،Gen ،Er
۱۸	۹٥	۱	Gen ،Col ،Tet ،Lin ،Neo ،Nfx
۱۹	۹٦	۱	Gen ،Col ،Tet ،Lin ،Neo ،Nfx
۲۰	۹۷	۱	Gen ،Tet ،Lin ،Neo ،NA ،LP
۲۱	۱۰۰	۱	Gen ،Flu ،Col ،Dfx ،Neo ،NA ،Nor ،Nfx ،Ofx
۲۲	۱۰۱	۱	Gen ،Flu ،Tet ،Dfx ،Lin ،Neo ،NA ،Nor ،Nfx ،Ofx
۲۳	۱۰۳	۱	Amp ،Amx ،Ty ،Gen ،Flu ،Tet ،Dfx ،Lin ،Neo،
۲٤	۱۰٤	۱	Amx ،Tet ،Lin ،Neo ،SXT
۲٥	۱۰٥	۱	Gen ،Tet ،Lin ،Neo
۲٦	۱۰٦	۱	Amp ،Amx ،Pen ،Vc ،Gen ،Tet ،Dfx ،Lin ،Neo ،NA
۲۷	۱۱۰	۱	Col ،Tet ،Lin ،Neo
۲۸	۱۱٤	۱	Gen ،Flu ،Col ،Tet ،Dfx ،Neo ،NA ،Nor ،Nfx ،Ofx
۲۹	۱۱٥	۱	Amp ،Amx ،Ty ،Er ،Flu ، Tet ،Dfx ،Lin ،Neo ،NA
۳۰	۱۱٦	۱	Amp ،Amx ،Pen ،Tv ،Er ،Vc ،Flu ،Tet ،Lin ،Neo ،NA
۳۱	۱۱۷	۱	Amx ،Ty ،Er ،Flu ،FlU ،Tet ،Lin ،Neo ،NA ،Nfx ،LP
۳۲	۱۱۸	۱	Amp ،Pen ،Gen ،Lin ،Neo ،LP
۳۳	۱۱۹	۱	Amx ،Ty ،Er ،Gen ،Lin ،Neo ،LP
۳٤	۱۲۰	۱	Gen ،Neo ،NA ،Ofx ،SXT
۳٥	۱۲۱	۱	Tet ،Lin ،Neo ،NA
۳٦	۱۲۲	۱	Tet ،Lin ،Neo ،Ofx ،STx
۳۷	۱۲۳	۱	Tet ،Dfx ،Lin ،Neo ،Nor ،Ofx
۳۸	۱۲٤	۱	Gen ،Flu ،Tet ،Dfx ،Neo ،Nfx
۳۹	۱۲٥	۱	Gen ،Flu ،Tet ،Dfx ،Lin ،Neo ،Nfx ،LP ،Ofx

پنی‌سیلین = Pen	کلرامفتیکل = Chl	انروفلوکساسین = Nfx	آمپی سیلین = Amp
نورفلوکساسین=Nor	افلوکساسین = Ofx	سولفامتوکسازول+تری‌متوپریم=SXT	آموکسی‌سیلین=Amx
تایلوزین = Ty	دایفلوکساسین= Dfx	لینکومایسین = Lin	کلیستین= Col
جنتامایسین = Gen	اسیدنالیدکسیک=NA	لینکوسپکتین = LP	تتراسایکلین = Tet
ونکومایسین = Vc	اریترومایسین = Er	نئومایسین = Neo	فلومکوئین = Flu

بحث

بیماری ورم روده نکروتیک به‌وسیله تکثیر باکتری *کلستریدیوم پر فرینجنس* تیپ A یا C در روده کوچک ماکیان ایجاد می‌شود که یک مشکل رایج در ماکیان، به‌ویژه در طیور گوشتی می‌باشد.

ورم روده نکروتیک در اروپا، آسیا و آمریکای شمالی در حال تبدیل شدن به یک بیماری عمومی است. در سال ۱۹۹۵، بیماری ورم روده نکروتیک ٤٪ از بیماری‌های گزارش شده در فرانسه را شامل می‌شد که در سال ۱۹۹۹ این رقم به ۱۲/٤درصد افزایش یافت (۲).

Devriese و همکاران در طی سال‌های ۱۹۹۱ و ۱۹۹۲ حداقل غلظت مهاری ۷ آنتی‌بیوتیک محرک رشد علیه ۹۵ جدایه فیلدی *کلستریدیوم پرفرینجنس* حاصل از طیور، خوک و گوساله را مورد ارزیابی قرار دادند. همه این سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های با مبرمایسین، فلاوومایسین (فلاووفسفولیپول) مقاومت نشان دادند ولی به آووپارسین، آویلامایسین و سالینومایسین حساس بودند. مقاومت اکتسابی بر علیه باسیتراسین در بعضی جدایه‌های طیور و گاو و مقاومت به تایلوزین و ویرجینیامایسین در بعضی جدایه‌های حاصل از تمام گونه‌های بررسی شده، شناسایی گردید (۱).

در بررسی که توسط Tansuphasiriu و همکاران در سال ۲۰۰۵ روی ۲۰۱ جدایه کلستریدیوم پرفرینجنس جدا شده از مدفوع انسان، خوک و غذا و سایر منابع محیطی (که به‌وسیله PCR تایید شده بود) نسبت به ۷ ترکیب ضدباکتریایی انجام شد، مشخص گردید که بیشترین مقاومت این جدایه‌ها به‌ترتیب در برابر تتراسایکلین (٥٦/۲درصد)، ایمیپنوم (۲٤/۹٪)، مترونیدازول(۹/٥٪)، پنی‌سیلین G (۹٪) و ونکومایسین(٤/٥)، کلرامفنیکل(۳٪) و سفتراکسون(۱٪) می‌باشد (۱۱).

در مطالعه حاضر طیف و میزان مقاومت جدایه‌ها به ترکیبات ضدباکتریایی گسترده و بالا بود به‌طوری‌که جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد بررسی بیشترین مقاومت را نسبت به ۳ ترکیب ضدباکتریایی لینکومایسین با ۸۰٪، تتراسایکلین با ۸۰٪ و نئومایسین سولفات با ۸۷/٥٪ نشان دادند. همچنین کمترین مقاومت جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* نسبت به کلرامفنیکل با صفر درصد و ونکومایسین با ۱۰٪، سولفامتوکسازول + تری‌متوپریم با ۱۷/٥٪ و پنی‌سیلین با ۲۰٪ بود.

Martel و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی خود حساسیت جدایه‌های کلستریدیوم پرفرینجنس که از روده طیور گوشتی از ۳۱ مزرعه مختلف گوشتی در بلژیک جدا شده بودند را نسبت به ۱۲ ترکیب آنتی‌بیوتیک که برای درمان، تحریک رشد یا پیشگیری از کوکسیدیوز به‌کار می‌رفت، ارزیابی نموده و نشان دادند که همه جدایه‌ها به‌طور یکسانی به آنتی‌بیوتیک‌های یونوفوره از قبیل مونسین، لازولاسید، سالینومایسین، مادورارمایسین و ناراسین حساس بودند (٦).

در این تحقیق نیز مانند مطالعه حاضر درصد بالایی از مقاومت نسبت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند لینکومایسین و تتراسایکلین دیده شد. در مطالعه فوق، افزایشی در میزان بروز مقاومت نسبت به مطالعات گذشته مشاهده شد (٦٣٪ در مقایسه با ٤٩٪) و نیز کاهشی در میزان درصد مقاومت به تتراسایکلین (٦٦٪ در مقایسه با ٧٤٪) مشاهده شد. با این‌حال Johansson و همکاران دریافتند که مقاومت به تتراسایکلین در سویه‌های جدا شده از ٣ کشور سوئد با ٧٦٪، دانمارک با ١٠٪ و نروژ با ٢٩٪ وجود دارد و در ٨٠٪ جدایه‌های مقاوم به تتراسایکلین (با روش PCR) ٢ ژن مقاومت،tetA(p) tetB(p) شناسایی گردید و تنها در ٢٠٪ جدایه‌های مقاوم به تتراسایکلین ژن tet A(p) وجود داشت. این درجات مقاومت به تتراسایکلین در جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* طیور گوشتی در سوئد، در حالی بود که میزان مصرف تتراسایکلین در طیور این کشور در کمترین مقدار بود (٤).

در بررسی‌های Johansson و همکاران در سوئد، دانمارک و نروژ بین سالهای ٢٠٠٢-١٩٨٦ مشخص گردید که ١٠٠٪ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از ماکیان نسبت به داروی ونکومایسین حساسیت نشان می‌دهند. این در حالی است که در مطالعه حاضر نیز مقاومت کمی (تنها ١٠٪) نسبت به این دارو مشاهده گردید. با این حال Jung در سال ١٩٨٣، ٥٠ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس* به‌دست آمده از نمونه‌های مدفوعی انسان را از نظرحساسیت به سفوتاکسیم، فوزفومایسین، پنی‌سیلین G و ونکومایسین به کمک روش میکروتیتر بررسی نمود و نتیجه گرفت که جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* در برابر پنی‌سیلین G و سفوتاکسیم مقاومتی ندارند.

علت وجود حساسیت نسبت به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها را می‌توان در میزان استفاده عملی از آن‌ها در سطح مزرعه ارزیابی نمود. به‌عنوان مثال علت حساسیت جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* استفاده شده در این مطالعه در برابر داروی ونکومایسین را می‌توان در عدم استفاده از این دارو به‌صورت تجاری در صنعت مرغداری کشورمان ارزیابی نمود. از طرف دیگر مصرف خودسرانه و بی‌رویه ترکیبات آنتی‌بیوتیکی می‌تواند زمینه‌ساز بروز مقاومت نسبت به آن دارو و ترکیبات هم خانواده آن‌ها شود .

نکته دیگر در این ارتباط آن است که در مواقع برخورد با بیماری آنتریت نکروتیک، به‌دلیل فراهم نبودن امکانات و یا رایج نبودن کشت بی‌هوازی جهت جدا سازی کلستریدیا، داروهای استفاده شده به‌صورت کور و تنها بر اساس تجربه برای گله مبتلا تجویز می‌گردد، که این خود می‌تواند عاملی برای مصرف نابجا و بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها باشد، که همین امر می‌تواند دلیلی دیگر برای بروز مقاومت جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* نسبت به برخی از ترکیبات دارویی باشد.

Martel و همکاران در سال ٢٠٠٤ در بررسی خود نشان دادند که افزایشی در میزان درصد مقاومت به لینکومایسین در مقایسه با گذشته وجود دارد (٦). اگرچه به‌نظر می‌رسد که مطالعه حاضر اولین مطالعه در ارتباط با بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* در ایران باشد، اما به‌علت مشاهده مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک مذکور، می‌توان گفت که نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر با مطالعه فوق مطابقت دارد.

سطح بالای مقاومت به لینکومایسین ممکن است ناشی از ژن‌های مقاومت باشد که هنوز مورد شناسایی قرار نگرفته‌اند. با توجه به نتایج جدول ١ مشخص می‌گردد که جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد مطالعه مقاومت نسبی از ٢٠٪ برای پنی‌سیلین تا ٣٠٪ نسبت به آموکسی‌سیلین نشان می‌دهند. این در حالی است که در بررسی Johansson در سوئد طی سال‌های ٢٠٠١ تا ٢٠٠٠ و Johansson و همکاران طی سال‌های ٢٠٠١ تا ١٩٨٦ در نروژ و Johansson و همکاران بین سال‌های ٢٠٠٢ تا ١٩٩٧ در دانمارک مشخص شد که ١٠٠٪ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* نسبت به آمپی‌سیلین حساس بودند.

در مطالعه حاضر طبق جدول ۳، جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد بررسی، ۳۹ الگوی مقاومت داروئی را از خود نشان دادند. ۹۵٪ جدایه‌ها در ۳۸ الگوی مقاومت دارویی متفاوت (یک الگو برای یک جدایه) و تنها ۵٪ جدایه‌ها در یک الگوی مقاومت دارویی (یک الگو برای ۲ جدایه متفاوت) قرار گرفتند.

Dutta و devriese در سال ۱۹۸۱ الگوهای متفاوت مقاومت دارویی بر علیه ماکرولید – لینکوزاماید و استرپتوگرامین در *کلستریدیوم پرفرینجنس* با منشاء حیوانات را یافتند (۳). در بررسی انجام شده توسط Tansuphasiriu بر روی جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرنجنس*، از ٤۷ جدایه با مقاومت چندگانه داروئی، ٦۳/۸٪ به ۲ تا ٦ دارو مقاوم بودند (۱). باید توجه داشت که الگوی مقاومت دارویی، یک پدیده محلی است و استفاده از ضد باکتری با توجه به الگوی مقاومت دارویی دیگر مناطق با کشور ما چندان جایز نبوده زیرا این الگوها بنا به مکان و زمان تغییر می‌نمایند. همچنین مطابق جدول ۲ مشخص گردید که ۲۲/۵٪ از جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بررسی شده (۹ عدد از مجموع ٤۰ جدایه) به بیش از ۱۰ ترکیب ضدباکتریایی از مجموع ۲۰ ترکیب ضدباکتریایی مورد آزمایش مقاوم بودند و درصد جدایه‌هائی‌که به بیش از ۱٤ ترکیب ضدباکتریایی مقاوم بودند تنها ۲/۵٪ (یک جدایه از مجموع ٤۰ جدایه) از جدایه‌های مورد آزمایش بود. این در حالی است که ۱۰۰٪ جدایه‌هایی که توسط ما مورد بررسی قرار گرفتند، به بیش از یک ترکیب مقاومت نشان دادند.

در بررسی که توسط Tansuphasiriu و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از مدفوع خوک، محیط، مدفوع انسان و غذا انجام گرفت، نشان داده شد که از بین ٦۲/۷٪ سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* مقاوم به ترکیبات ضدباکتریایی، ۳۹/۳٪ سویه‌ها به یک دارو و ۲۳/٤٪ مقاومت چندگانه دارویی را دارا بودند. با توجه به مقاومت‌های چندگانه و الگوهای بسیار متنوع مقاومت که حتی باکتری‌های جدا شده از یک مزرعه نشان می‌دادند شاید بتوان نتیجه‌گیری نمود که درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری آنتریت نکروتیک در یک مزرعه می‌تواند بسیار پیچیده باشد، اما در صورتی‌که بتوان با انجام آنتی‌بیوگرام بر روی تعداد مناسبی از تلفات، الگوی مقاومتی غالب در گله را شناخت یا حداقل به آن نزدیک شد، می‌توان به درمان های مؤثرتر در گله‌های مبتلا اقدام نمود.

فهرست منابع

1. Devriese, L.A., Daube, G., Hommez, J. and Haesebrouck, F. (1993): In vitro susceptibility of clostridium perfringens isolated from farm animals to growth-enhancing antibiotics. Journal of Applied Bacteriology, 75: 55-57.
2. Drouin, P. (1999): Retour en force de l enterite necrotique. Filieres Avicoles, 78-79.
3. Dutta, G.N. and Devriese, L.A. (1981): Macrolide-Lincosamide-streptogramin resistance patterns in clostridium perfringens from animals. Antimicrob Agents chemother., 19(2): 274-8.
4. Johansson, A., Greko, C., Engstrom, B.E. and Karlsson, M. (2004): Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of clostridium perfringens from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. Vet. Microbiol., 99 (3-4): 251-7.
5. Jung, W.K. (1983): Susceptibility of 50 isolates of clostridium perfringens to cefotaxime, fosfomycin, penicillin G. and vancomycin; Variable tolerance for vancomycin. Chemotherapy, 29 (2): 99-103.
6. Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., De Gussem, K., Decostere A, and Haesebrouck, F. (2004): Susceptibility of clostridium perfringens strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. Avian pathology, 33: 3-7.

7. Miller, D.A. (1998): Clostridial diseases, p. 61-68. *In* D. E. Swayne, J.R. Glisson, M.M. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed (ed.), A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA.
8. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2002): Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell publishing, Iowa State press, USA., pp: 28-35.
9. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. (1994): Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe publishing, London, UK.
10. Summanen, P., Baron, E.N., Citron, J., Strong, D.M., Wexler, H.M. and Firegold, S.M. (1993): Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 5th ed., Star publishing company, Belmont. California, pp: 248-288
11. Tansuphasiriu, M.W. and Sang S.K.L. (2005): Antimicrobial Resistance among clostridium perfringens solated from various sources in Thailand. Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health, 36(4): 954-61.
12. Watkins, K.L., shryock, T.R., Dearth. R.N. and Saif, Y.M. (1997): In vitro antimicrobial susceptibility of clostridium perfringens from commercial turkey and broiler chickens origin. Vet. Microbial., 54(2): 195-200.