

جداسازی باکتری‌ها از سگ‌های بیمار مبتلا به آنتریت هموراژیک و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

ابراهیم پورمیربلوک جلالی^۱، محمد داداش‌بیگی^{۱*}، لیلا اسدپور^۱

چکیده

هدف از این تحقیق جداسازی عوامل مولد آنتریت هموراژیک در سگها و تعیین مقاومت یا حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج (جتنامایسین، تتراسیکلین، نالیدیکسیک اسید، سفکسیم، سفتریاکسون، پنی سیلین، کلرامفنیکل، کوتریموکسازول) بود. در این تحقیق از تعداد ۸۰ قلاده سگ در سنین بین شش ماهگی تا دوسالگی مبتلا به آنتریت هموراژیک که آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند نمونه مدفوع اخذ شد و روی محیط کشت مختلف جهت تشخیص عوامل باکتریال مولده برده شد، که پس از بررسی باکتریولوژیک چهار باکتری اشریشیاکلی و کلستریدیوم و کمپیلوباکتر و سالمونلا از نمونه‌ها جدا گردید که از مجموع ۸۰ قلاده سگ ۲۱/۲۵ درصد مبتلا به سالمونلا و ۸/۷۵ درصد مبتلا به کلستریدیوم و ۲۶/۲۵ درصد مبتلا به کمپیلوباکتر و ۴۳/۷۵ درصد مبتلا به اشریشیاکلی بودند. نقش بیماری‌زایی اشریشیاکلی در بروز آنتریت هموراژیک از سایر باکتری‌ها بیشتر نشان داده شده و نتایج آنتی بیوگرام نیز بیانگر مقاومت این باکتری نسبت به اکثر گروه‌های آنتی بیوتیکی مورد آزمایش بود. ولی این باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفتریاکسون و سفکسیم حساسیت خوبی نشان داد. سایر باکتری‌ها نیز در نمونه‌های بعدی نسبت به این دو دارو حساسیت خوبی را نشان دادند.

واژگان کلیدی: سگ، باکتری، آنتی بیوتیک، آنتریت هموراژیک

مقدمه

درمان بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود و در این زمینه موفقیت‌های زیادی به دست آمده است (۶ و ۸). ولی امروزه استفاده زیاد و نامناسب از داروهای ضد باکتریایی در پزشکی و دامپزشکی منجر به افزایش جداسازی سویه‌های مقاوم در برابر یک یا چند آنتی بیوتیک شده است و این مقاومت‌ها دائماً در حال افزایش است (۱۱ و ۱۷). در واقع باکتری‌ها علی‌رغم

آنتی‌بیوتیک‌ها بواسطه نقشی که در پیشگیری و درمان بیماری‌ها دارند، همواره به عنوان تکیه گاهی ارزشمند در تامین سلامت جامعه بشری بوده‌اند. سال‌هاست که از آنتی‌بیوتیک‌ها در جهت کنترل و

۱- گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

*- نویسنده مسئول dadashbeigi@iaurasht.ac.ir

نئومایسین ۳۸/۸ درصد، جنتامايسين ۹ درصد گزارش شد و تمامی جدایه‌ها به آمپی‌سیلین، نورفلوکساسین، کلرامفنیکل و سولفامتوکسازول، تری متوپریم حساس بودند (۱۰ و ۱۸).

در این تحقیق هم عوامل باکتریایی آنتریت هموراژیک سگ‌های ارجاعی به درمانگاههای دامپزشکی شهرستان رشت جداسازی و میزان مقاومت آنتی بیوتیکی آنها بررسی گردید. همچنین رابطه بین سن و جنس دام‌های بیمار با شیوع بیماری و میزان مقاومت دارویی مطالعه شدند.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با استفاده از ۶۸۰ نمونه ارجاعی به درمانگاههای دامپزشکی شهرستان رشت در طی ۹ ماه از مهر ۱۳۸۷ تا خرداد ۱۳۸۸ انجام شد. در این بررسی از مخاط و مدفوع ۸۰ قلاده سگ مبتلا به آنتریت هموراژیک ارجاعی به درمانگاههای دامپزشکی شهرستان رشت (از مجموع ۶۸۰ سگ ارجاعی مورد بررسی اولیه) که از دو جنس نر و ماده و در سنین ۲ ماه الی ۶ سال بودند، با استفاده از سوآپ استریل نمونه گیری به عمل آمد. نمونه‌ها بلافاصله بر روی محیط آگار خوندار، آگار مک کانکی، سلنیت F، کری بلر کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از آن نمونه از محیط سلنیت F به آگار سالمونلا - شیلا و از محیط کری بلر به محیط اسکایرو آگار و آگار خوندار انتقال داده شد. محیط کشت اسکایرو آگار در گرمخانه ۳۷ درجه و شرایط میکروانرفیل به مدت ۶ روز قرار داده شد و کشت آگار خوندار در جار بی هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. همزمان کلنی‌های خالص رشد یافته برای شناسایی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس ابتدا از دو کلنی خالص گسترش تهیه شد و به روش گرم رنگ آمیزی گردید و نتیجه آن همراه با مورفولوژی باکتری مشخص گردید.

ساختار ساده ای که دارند، قادر به ایجاد سويه های مقاوم و انتقال و گسترش مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های متداول هستند (۷).

حیوانات خانگی مثل سگ و گربه، به دلیل تماس نزدیک با صاحبان خود نقش مهمی در انتقال مقاومت دارویی به انسان دارا هستند. لذا آگاهی از بروز مقاومت‌های دارویی در این حیوانات می‌تواند در کاهش مقاومت‌ها نقش بسزایی داشته باشد (۲۱).

به علاوه بسیاری از عوامل باکتریایی جدا شده از مدفوع سگ‌ها مثل گونه‌های مختلف سالمونلا، اشریشیاکلی، کلستریدیوم و کمپیلوباکتر از عوامل متداول آنتریت و انترتوکسمی در انسان نیز هستند و می‌توانند برای بهداشت انسان مخاطره آمیز باشند (۴، ۱۵، ۱۷ و ۱۹). لذا جداسازی عوامل باکتریایی اسهال سگ‌ها و تعیین میزان مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک‌های متداول در درمان آنتریت هموراژیک سگ‌ها، امکان شناسایی داروهایی که باکتری‌ها مقاومت بیشتری نسبت به آنها کسب کرده‌اند و جایگزین کردن داروهای موثر نقش مهمی در درمان موثر بیماری دام، و نیز حفظ بهداشت و سلامت جوامع انسانی دارد.

پیش از این محققین عوامل باکتریایی جدا شده از ۶۵ قلاده سگ مبتلا به اسهال را بررسی کردند که در ۲۵ مورد عامل اسهال در توله‌های زیر ۶ ماه باکتری اشریشیاکلی مهاجم روده ای بوده است (۳). همچنین دانشمندان مدفوع ۱۳۰ قلاده سگ سالم و مبتلا به اسهال را از نظر آلودگی به کمپیلوباکتر بررسی کردند که در ۴۶/۹ درصد موارد نتیجه مثبت بود (۱۹). در بررسی‌ها از مدفوع ۵۱/۱ درصد سگ‌ها و ۷۵ درصد گربه‌های مورد مطالعه، باکتری کمپیلوباکتر جدا گردید (۲). هم مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای جدا شده از مدفوع سگ‌های غیر اسهالی را بررسی کردند. در این بررسی ۸۵/۱ درصد از سالمونلاهای جدا شده به یک یا چند آنتی بیوتیک مقاوم بودند. مقاومت به استرپتومايسين ۸۰/۶ درصد، سفالوتین ۳۷/۳ درصد،

سفتری‌اکسون، ۹۰ درصد به سفکسیم، ۵۰ درصد به نالیدیکسیک اسید و ۵۲/۵ درصد به کوتریموکسازول حساس بودند (جدول شماره ۲). همچنین حساسیت آنتی بیوتیکی در باکتری‌های جدا شده از دام‌های جوانتر بیشتر از باکتری‌های جدا شده از دام‌های مسن تر بوده است (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۱- میزان و درصد عوامل باکتریایی جدا شده از آنتریت هموراژیک سگ‌ها

| نوع باکتری | درصد | تعداد |
|-------------|-------|-------|
| اشریشیاکلی | ۴۳/۷۵ | ۳۵ |
| کمپیلوباکتر | ۲۶/۲۵ | ۲۱ |
| سالمونلا | ۲۱/۲۵ | ۱۷ |
| کلستریدیوم | ۸/۷۵ | ۷ |

جدول شماره ۲- تاثیر آنتی بیوتیک‌ها بر باکتری‌های جدا شده از آنتریت هموراژیک سگ‌ها

| نوع آنتی بیوتیک | تعداد و درصد R | تعداد و درصد S | تعداد و درصد Im |
|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| جنتامایسین | ۱۶/۲۵ و ۱۳ | ۶۷/۵۰ و ۵۴ | ۱۶/۲۵ و ۱۳ |
| پنی‌سیلین | ۶۷/۵۰ و ۵۴ | ۲۵/۰ و ۲۰ | ۷/۵۰ و ۶ |
| کلرامفنیکل | ۲۰/۰ و ۱۶ | ۶۵/۰ و ۵۲ | ۱۵/۰ و ۱۲ |
| تتراسایکلین | ۶۷/۵۰ و ۵۴ | ۲۱/۲۵ و ۱۷ | ۱۱/۲۵ و ۹ |
| سفترتاکسون | ۲/۵۰ و ۲ | ۹۵/۰ و ۷۶ | ۲/۵۰ و ۲ |
| سفکسین | ۵/۰ و ۴ | ۹۰/۰ و ۷۲ | ۵/۰ و ۴ |
| نالیدیکسیک اسید | ۲۷/۵۰ و ۲۲ | ۵۰/۰ و ۴۰ | ۲۲/۵۰ و ۱۸ |
| کوتریموکسازول | ۲۷/۵۰ و ۲۲ | ۵۲/۵۰ و ۴۲ | ۲۰ و ۱۶ |

R: باکتری‌های جدا شده مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها

S: باکتری‌های جدا شده حساس به آنتی بیوتیک‌ها

Im: تاثیر متوسط آنتی بیوتیک‌های انتخابی بر باکتری‌های جدا شده

جدول شماره ۳- درصد و تعداد باکتری‌های جدا شده حساس به آنتی بیوتیک‌های مورد آزمایش برحسب سن

| سن | تا شش ماه | از شش ماه تا دو سال | از دو سال به بالا |
|-------------|------------|---------------------|-------------------|
| نوع باکتری | تعداد درصد | تعداد درصد | تعداد درصد |
| اشریشیاکلی | ۶۲/۸۵ ۲۲ | ۲۰ ۷ | ۱۷/۱۵ ۶ |
| کمپیلوباکتر | ۵۸/۸۲ ۱۰ | ۳۳/۲۹ ۶ | ۵/۸۸ ۱ |
| سالمونلا | ۴۸/۶۱ ۱۰ | ۳۸/۰۹ ۸ | ۱۴/۲۸ ۳ |
| کلستریدیوم | ۰ ۰ | ۰ ۰ | ۱۰۰ ۷ |

سپس کلنی‌های خالص هر محیط توسط واکنش‌های بیوشیمیایی استاندارد مورد تشخیص نهایی قرار گرفت (طباطبایی و فیراوی، ۱۳۸۶)

سپس از باکتری‌ها سوسپانسیون استاندارد تهیه شد. بدین ترتیب که باکتری مورد آزمایش از روی محیط آگار مغذی توسط سوآپ استریل برداشته شده و در محیط آبگوشت مولر هیتون کشت داده شده و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا زمانی که کدورت محیط کشت باکتری با کدورت استاندارد مک فارلند یکسان گردد (۱۵). پس از آن آزمایش آنتی بیوگرام به روش انتشار از دیسک برای تعیین وجود یا عدم وجود مقاومت در باکتری‌های مورد مطالعه انجام شد. بدین ترتیب که با استفاده از سوآپ استریل باکتری مورد نظر از سوسپانسیون استاندارد تهیه شده، بر روی محیط آگار مولر هیتون به طور یکنواخت کشت داده شده و دیسک‌های آنتی بیوتیکی مورد نظر در سطح محیط گذاشته شد. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون براساس رشد یا عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی بیوتیکی، حساسیت یا مقاومت باکتری مشخص گردید. در صورت عدم رشد باکتری در اطراف دیسک آنتی بیوتیکی قطر هاله عدم رشد با خط‌کش اندازه‌گیری شد و قطر هاله بر حسب میلی‌متر به عنوان نتیجه آزمایش آنتی بیوگرام یادداشت گردید (۱۵).

نتایج

خلاصه‌ی از نتایج آزمایش در جداول شماره ۱ و ۲ ارائه شده است. در این بررسی از مجموع ۸۰ نمونه گرفته شده از اسهال هموراژیک سگ‌ها، در ۲۱/۲۵ درصد موارد باکتری سالمونلا، ۲۶/۲۵ درصد کمپیلوباکتر و ۴۳/۷۵ درصد اشریشیاکلی جدا گردید. از مجموع ۸۰ نمونه، ۶۷/۵ درصد نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین، ۲۰ درصد به پنی سیلین، ۵۲ درصد به کلرامفنیکل، ۱۷ درصد به تتراسایکلین، ۹۵ درصد به

از کلستریدیوم پرفرانزانس انجام شده در ۲۱ درصد موارد مقاومت به تتراسیکلین و سایر موارد های متداول در درمان اسهال سگ ها مشاهده گردید که در ۱۳ درصد موارد مقاومت به تتراسیکلین در بین باکتریها قابل انتقال بوده است (۱۲).

بررسی ها نشان داده است که اگر درمان اسهال باکتریایی سگ ها از پری بیوتیک ها استفاده شود دوره اسهال در مقایسه با استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان به نصف کاهش می یابد (۴). دامپزشکان و کارشناسان بهداشت عمومی معتقدند دفع سالمونلا به وسیله سگ های آلوده یک منبع آلودگی بر روی صاحبان این دام ها می باشد ۱۶ قلابه سگ را با غذای خام آلوده به سالمونلا تغذیه نمودند که از این تعداد ۷ قلابه سگ به مدت ۷-۱ روز پس از دریافت آلودگی باکتری سالمونلا در مدفوع دفع کردند (۱۶).

با جدا کردن ۲۴ باکتری اشیریش کلی سویه همولایتیک از موارد اسهال سگ ها، بیان کردند که سویه های جدا شده از اسهال سگ ها به سویه های جدا شده از انسان، خوک و گاوهای مبتلا به اسهال بسیار مطابقت داشته اند (۱۳).

در طی چند دهه گذشته گونه های کمپیلوباکتر به عنوان یک عامل متداول آنتریت در انسان و حیوانات مورد توجه قرار گرفته است. کمپیلوباکتریوز روده ای یک بیماری ژئونوز شایع در کشورهای پیشرفته می باشد. درمان آنتی بیوتیکی سگ های مبتلا به کمپیلوباکتریوز بالینی، سبب کاهش دوره بیماری و تخفیف مدت آن می گردد زمان رفع میکروارگانیزم از حیوان کاهش نیافته و در نتیجه خطر تماس انسان به این باکتری کاهش خواهد یافت (۶) محققین حساسیت آنتی بیوتیکی ۵۱ سویه کمپیلوباکتر که از ۲۹ قلابه سگ مبتلا به اسهال و ۲۲ قلابه سگ به ظاهر سالم جدا شده بودند را نسبت به آنتی بیوتیک های سفالکسین، اریترومایسین، جیتامایسین، انروفلوکسالین، کلرامفنیکل و اکسی تتراسیکلین بررسی نمودند. نتایج نشان داد

چنانچه در جداول نتایج مشاهده می شود میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های جدا شده از اسهال هموراژیک سگ ها نسبت به هشت نوع آنتی بیوتیک مورد مطالعه در سنین مختلف فراوانی های متعددی دارد که با توجه به نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی که در جدول ۲ منعکس شده، باکتری های جدا شده بیشترین مقاومت را نسبت به پنی سیلین و تتراسیکلین داشته اند. علت این امر می تواند ناشی از مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک ها در پزشکی و دامپزشکی باشد.

همچنین در بررسی آماری با سطح اطمینان نود و پنج درصد، مقاومت آنتی بیوتیک باکتری های جدا شده از گروه های سنی مختلف، تفاوت معنی داری داشت. علت این امر می تواند دریافت آنتی بیوتیک و همچنین کسب میکروب های مقاوم در طول زندگی این دام ها باشد. در گزارش سایر محققان نیز رابطه مستقیمی بین مصرف طولانی مدت روزهای غیردرمانی آنتی بیوتیک و افزایش مقاومت باکتری های بیماری زا و فلور روده ای آنها منتشر شده است (۱۹).

بحث

مقاومت آنتی بیوتیک باکتریهای جدا شده از گروه های سنی مختلف، تفاوت معنی داری داشته است که علت این امر می تواند ناشی از بیشتر بودن تعداد موارد دریافت آنتی بیوتیک و همچنین کسب میکروبهای مقاوم در طول زندگی این دامها باشد بطوریکه در گزارش سایر محققین نیز رابطه مستقیم بین مصرف طولانی مدت روزهای غیر درمانی آنتی بیوتیک و افزایش مقاومت باکتریهای بیماری زا و فلور روده ای به آنها دیده شده است (۱۵).

کلستریدیوم پرفرانزانس یک عامل شناخته شده اسهال خفیف خود محدود شونده و همچنین عامل سندروم اسهال هموراژیک یک کشنده در سگ است. در مطالعه ای که بر روی سگ های مبتلا به اسهال ناشی

منابع

- ۱- طباطبایی، ع، فیروزی، ر. (۱۳۸۶): بیماری‌های باکتریایی دام. انتشارات دانشگاه تهران
- 2- Acke, E., (2006): Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in cats and dogs, *Veterinary Record*. 151-158
- 3- Adsesiyum, A.A., Compbell M., Kamingologs., (1992): prevalence of bacterial enteropathogens in pet dogs in Trinidad. *Veterinary Medicin*. 44(1):19.
- 4- Alvah C, Bihner, P.H.D, CPE and JM. Smith, (2008): Department of environmental work , university of Washington. *vitality Science*.
- 5- Black, D.P., Itillman K., Fenlon D. R., Low J. C., (2003): Transfer of antibiotic Resistance between *Commensal* and [athogenic members of the enterobacteriaceae under ideal conditions. *Applied Microbiology*. 95(3):428-436.
- 6- Boosinger T.R, and Dillon A.R, (1992): *Campylobacter* Jejuni infections in dogs and the effect of erythromycin and tetracycline therapy on fecal shedding *J. Am. Anim. Hos. Assoc.* 28: 33-38
- 7- Brock, T.D., (1991): *Biology of micro organisms*. 6th ed. Prentice Hall. Inc London , 251-252, 261-269
- 8- Brooks, G.F., Butel J.S., Jawets, Melnick Adelbergs, (1998): *Medical Microbiology*, 21st ed. 90-109 and 145-176.
- 9- Empn, J.S., (2004): Tetracycline in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinary medicine*. 3:79-100.
- 10- Gebreyes, W. A., Thankur, S., (2005): Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serovar muenchen from pigs and humans and potential inter server transfer of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*. 49(2):503-511.
- 11- Jasir, A., and Schalen ,C., (1997): Erythromycin resistance phenotypes in swedish clinical isolates of group A streptococci. Cited by Horaud.T, Bouret.A, Leclereq.R, Sicardm. *Streptococcus*
- اریترومایسین، اتروفلوکسالیین و جنتامایسین را می توان جهت درمان کمپیلوباکتریوزیس پیشنهاد نمودند (۱۳ و ۱۴).
- نکته مهم دیگری که باید مد نظر قرار گیرد این است که در این آزمایش اثر آنتی بیوتیک‌ها بر درمان اسهال هموراژیک سگها بررسی و گزارش شد. اما بهتر است در پژوهش‌های آتی، مقاومت و حساسیت به جای اسهال، نسبت به هر باکتری به‌طور جداگانه تعیین شود.
- بطور کلی مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها، ارائه داروهای تقلبی و در نتیجه پایین بودن دز مصرفی دارو و تداوم آن و مصرف نادرست آنتی بیوتیک‌ها را می‌توان اصلی ترین دلایل بروز مقاومت آنتی بیوتیکی برشمرد. گسترش این مقاومت‌ها در دهه های اخیر، لزوم استفاده محتاطانه از عوامل ضد میکروبی در دامپزشکی و پزشکی جهت متوقف کردن روند افزایشی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی، قبل از آنکه از کنترل خارج گردد را ایجاب می‌کند.

ptococi and the host.418-445.

12- Khater EJ , Marks SL , Foley JE. (2006): Determination of the Prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium Perfringence* isolates. *Vet Microbiology*. 10:113(1-2): 97-101.

13- Marjancastar, J., R. Johnson, Adam L., S. Tell, J. Vandergoot, HM Hendriks, C. Vanvorstenbosch, L. van Dijk, and W. Gaastra. (2002): Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains. *Vet. Microbiol*. 85: 361-377.

14- Modulo, J.R., R. Giuffrida, C.A. de M. Lopes. (2003): Antimicrobial susceptibility of 51 *Campylobacter* strains isolated from diarrheic and diarrhea- free dogs. *Inst Biology*. 70: 283-286.

15- Quinn, P.J., Carter M.E., Mawkey Band G.R., (2001): *Clinical Veterinary Microbiology*. Philadelphia.220-221.

16- Rita, F, C. Ribble , J. Aramini , M. Vander Meer, M. Popa, M. litman , and R. Reid-Smith. (2007): The risk of *Salmonellae* shedding by dogs fed *Salmonellae* Contaminated commercial raw Food diets. *Can. Vet. J*. 48 (1): 69-75.

17- Schear., A., Micheal, S., (2003): *Clinical Medicine of the Dog and Cat*.300-302.

18- Seeper,S.,Singh,N,Adesivum,A.A.,Seebara msingh,R.,(2004). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. In non diarrhoeas goes in Trinidad. *J. vet med B infect Dis vet med B infect Dis vet public Health Seo*.51(7): 337-420.

19- Suzanne, N., et al., (2005): Pet dog and chicken meat as reservoirs of *campylobacter* spp in barbados. *Journal of clinical microbiology*,43(6):2642-2650.

20- Vanderwaaiy, D., Nord, C.E, (2005): Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria an analysis and a new approach to this argent problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*.16:191-97.

21- Water, R., (2005): Antimicrobial resistance

in zoonotic bacteria isolated from animals in different countries. *British Society for Antimicrobial Chemotherapy Press*.