مقاله پژوهشی

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره۱– بهار ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از قطعات بسته‌بندی‌شدهٔ بال، گردن، کبد و سنگدان مرغ گوشتی در شمال شرق ایران

عنوان کوتاه : جداسازی و تعیین مقاومت ضدمیکربی *کلستریدیوم پرفرینجنس*

مریم پورسلطانی[۱] ، جمشید رزم‌یار[۲*] ، محمد محسن‌زاده[۱] و سید مصطفی پیغمبری[۳]

۱.گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲.گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳.گروه بیماری های طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت : ۱۳۹۲/۰۱/۱۵

پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱۵

انتشارآنلاین :۱۳۹۲/۰۸/۱۵

IJMM1392; 7(1):P 35-39

نویسنده مسئول :

جمشید رزم‌یار

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد ، مشهد، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۳۸۷۳۲۵۸

پست الکترونیک:

jrazmyar@um.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* به‌عنوان عامل بسیاری از بیماری‌های روده‌ای چون انتریت نکروتیک و انتریت هموراژیک در حیوانات و مسمومیت غذایی در انسان است. هدف از این مطالعه، تعیین میزان آلودگی قطعات بسته‌بندی‌شدهٔ بال، گردن، کبد و سنگدان مرغ گوشتی عرضه‌شده در مراکز فروش مواد پروتئینی به *کلستریدیوم پرفرینجنس* و همچنین تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در پزشکی و دامپزشکی است.

مواد و روش کار: در این مطالعه تعداد ۱۸۰ نمونه قطعه بسته‌بندی‌شدهٔ گردن، بال، کبد و سنگدان مرغ به‌صورت تازه و غیرمنجمد از مراکز عرضه‌کنندهٔ مواد پروتئینی در مشهد به‌صورت مقطعی و کاملاً تصادفی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به‌طور متوالی روی محیط آگار خون‌دار حاوی۷٪ خون دفیبرینهٔ گوسفند و همچنین روی محیط کشت اختصاصی TSN و TSC ، کشت گردیدند. کلیه جدایه‌ها نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک مختلف با استفاده از روش انتشار از دیسک تعیین حساسیت شدند.

یافته‌ها: ازمجموع ۱۸۰ نمونه مورد بررسی از ٦ نمونه (شامل ۲ نمونه بال، ۲ نمونه کبد، ۱ نمونه سنگدان و ۱ نمونه گردن)*کلستریدیوم پرفرینجنس* جداسازی گردید.

نتایج حاصل از بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که کلیه جدایه‌ها (۱۰۰٪) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، جنتامایسین و کلوکساسیلین مقاوم هستند. همچنین ۱۰۰ درصد جدایه‌ها نسبت به سفالکسین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین حساسیت نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که امکان آلودگی مواد غذایی به *کلستریدیوم پرفرینجنس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارد که می‌تواند تهدیدی برای بهداشت و سلامت جامعه محسوب شود.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم پرفرینجنس*، مرغ گوشتی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی

کپی رایت © : حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* یک باکتری گرم‌مثبت، بی‌هوازی و هاگ‌دار است که در همه جا یافت می‌شود و عامل تعداد زیادی از بیماری‌ها در انسان و حیوانات مختلف است (۱،۲). همچنین نشان داده شده است که این باکتری یکی از مهم‌ترین باکتری‌های ایجادکننده مسمومیت غذایی در انسان بوده که اکثرا به دنبال مصرف گوشت ماکیان ایجاد می‌شود. طبق مطالعات انجام‌شده در سال‌های اخیر، بعد از کمپیلوباکتر و سالمونلا بیشترین علت ایجاد مسمومیت‌های غذایی در انسان مربوط به این باکتری است، به‌طوری‌که سومین عامل رایج در ایجاد مسمومیت غذایی در آمریکا و انگلیس، *کلستریدیوم*

پرفرینجنس شناخته شده است (۳،۴). در مطالعه‌ای که در نروژ در سال ۱۹۹۶ انجام شد، این باکتری به‌عنوان رایج‌ترین عامل ایجاد مسمومیت غذایی در انسان مطرح گردید (۵).

پتانسیل بیماری‌زایی این باکتری، به توانایی تولید حداقل ۱۳ نوع سم و آنزیم تولیدشده توسط آن نسبت داده می‌شود. *کلستریدیوم پرفرینجنس* براساس توانایی تولید ۴ سم اصلی کشنده که شامل سم‌های آلفا، بتا، یوتا و اپسیلون است، به ۵ تیپ مختلفA، B، C، D وE تقسیم می‌شود(۶،۷). انتریت نکروتیک در پرندگان،اکثراً توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* نوع A و به میزان کمتر توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* نوعC ایجاد می‌شود، اما در مواردی سویه‌هایی از تیپ D نیز جدا شده‌اند (۱،۸).*کلستریدیوم پرفرینجنس* باعث ایجاد بیماری‌های مهمی در انسان از جمله اسهال با منشاء آنتی‌بیوتیکی، مسمومیت غذایی، اسهال تک‌گیر، قانقاریا و انتریت نکروتیک می‌شود(۳). در میان تیپ‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس*، تیپ A و C می‌توانند باعث ایجادمسمومیت- عفونت غذایی در انسان گردند. مسمومیت غذایی ایجادشده توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A در نقاط مختلف دنیا بسیار رایج است و اغلب خودبهبودشونده است، اما مسمومیت غذایی ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C بسیار کمتر و به‌شدت خطرناک است که در انسان باعث ایجاد انتریت نکروتیک می‌گردد (۹-۱۲).

هدف از این مطالعه، تعیین میزان آلودگی قطعات بسته‌بندی‌شدهٔ بال، گردن، کبد و سنگدان مرغ گوشتی عرضه شده در مراکز فروش مواد پروتئینی به *کلستریدیوم پرفرینجنس* و همچنین تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در پزشکی و دامپزشکی است.

مواد و روش ها:

جداسازی و شناسایی کلستریدیوم پرفرینجنس

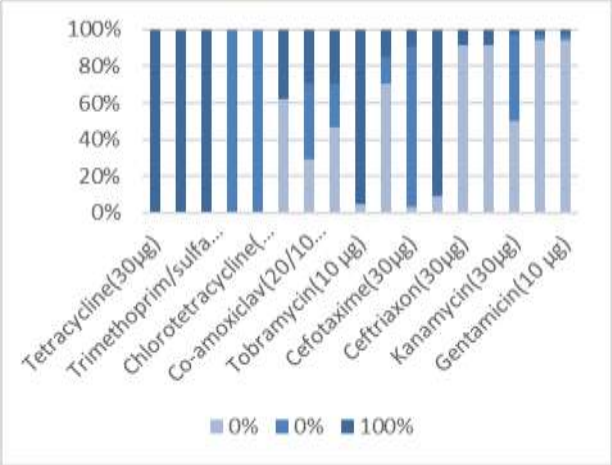
در یک مطالعه مقطعی تعداد ۱۸۰ نمونهٔ بسته‌بندی‌شده و غیرمنجمد گردن، بال، کبد (هر کدام ۵۰ عدد) و سنگدان (۳۰ عدد) به‌صورت تصادفی از فروشگاه‌های عرضه در کلان‌شهر توریستی مذهبی مشهد، مرکز استان خراسان رضوی در طی سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در شرایط سرد و دمای۴°C به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ۱۰ گرم از هر نمونه با ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت آب پپتونه کاملا هموژن گردید. سپس ۴ میلی‌لیتر از محلول هموژن شدهٔ حاصل با ۹ میلی‌لیتر محیط مایع تیوگلیکولات (FTG) کشت داده و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند (۱۰). بعد از این مدت از نمونه‌ها گسترش میکربی تهیه شد و بعد از رنگ‌آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌هایی که واجد باسیل‌های گرم‌مثبت حاوی هاگ بودند، برروی محیط آگار خون‌دار حاوی ۷٪ خون دفیبرینه گوسفند، به‌طورخطی کشت داده شدند. پلیت‌های کشت‌داده‌شده، به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C و شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند.

از پرگنه‌های رشدکرده بر روی محیط آگار خون‌دار با همولیز دوگانه که در رنگ‌آمیزی گرم به‌عنوان باسیل گرم‌مثبت شناخته شده بودند برداشته و برروی محیط‌های اختصاصی رشد *کلستریدیوم پرفرینجنس*یعنی TSC وTSN آگار کشت گردید (۱۱). باکتری‌های خالص‌شده جهت انجام آزمایشات بعدی در محیط مایعBHI همراه با گلیسیرین در دمای۲۰ °C نگهداری شدند. (کلیه محیط‌های کشت از شرکت های مدیا هند تهیه شد).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های کلستریدیوم پرفرینجنس

برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های*کلستریدیوم پرفرینجنس* نسبت به داروهای ضدمیکربی با توجه به محدودیت‌های موجود از روش انتشار ازدیسک استفاده گردید. بدین ترتیب که از هر یک از جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*، از محیط مغذی عصاره قلب و مغز (BHI) برداشت و روی محیط آگار خون‌دار حاوی۷٪ خون دفیبرینه گوسفند کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری گردید. سپس تعداد ۴ تا ۵ پرگنه *کلستریدیوم پرفرینجنس* از محیط آگار خون‌دار برداشت شد و به یک لولهٔ آزمایش حاوی محیط کشت مغذیBHI انتقال داده شد. محیط تلقیح‌شده به‌مدت ۲ تا ۸ ساعت در دمای۳۷°C و شرایط بی‌هوازی تا به‌دست آمدن کدورت واضح معادل با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (۱/۵×۱۰^۸cfu/ml) گرمخانه‌گذاری گردید. سپس با استفاده از سواپ استریل به‌صورت خطی و بدون فاصله بین خطوط بر روی سطح محیط کشت مولرهینتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده شامل: سفتریاکسون (30µg) ، جنتامایسین (10µg)، پنی سیلین (10IU)، کلرامفنیکل (30µg)، اریترومایسین (15µg)، سفالکسین

(30µg)، استرپتومایسین (10µg)، تتراسیکلین (30µg)، سفیکسیم (5µg)، لینکومایسین (15µg)، آموکسی‌سیلین (25µg)، نورفلوکساسین (10µg)، اکسی‌تتراسیکلین (30µg)، کلوکساسیلین (5µg)، و آمپی‌سیلین (10µg) بودند که از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه گردیدند.



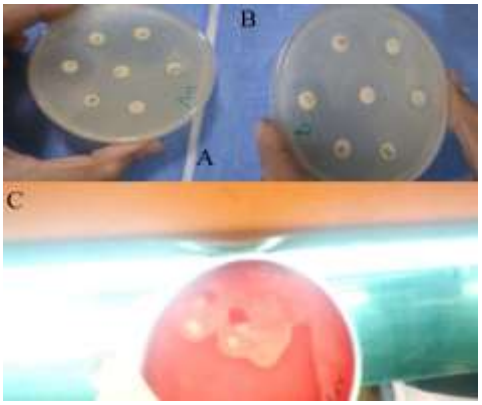
نمودار ۱: نتایج حاصل از بررسی حساسیت ضدمیکربی تعداد ۶ جدایه کلستریدیوم پرفرینجنس نسبت به ۱۵ آنتی‌بیوتیک مورد بررسی

دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد آزمایش توسط پنس استریل با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت تلقیح‌شده قرار داده شدند. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای۳۷°C و در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. حساسیت یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی هر یک از جدایه‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و مقایسه آن با راهنمای شرکت تولیدکننده دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تعیین گردید. در این مطالعه از سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*CIP106157 و CIP6061 به‌عنوان سویه‌های استاندارد استفاده گردید.

یافته‌ها:

از مجموع ۱۸۰ نمونهٔ گردن، بال، کبد و سنگدان مورد بررسی، ۶ نمونه پس از کشت‌های متوالی روی محیط‌های آگار خون‌دار حاوی ۷٪ خون دفیبرینه گوسفند و محیط‌های کشت اختصاصیTSN وTSC، مثبت شناخته شدند. در محیط آگار خون‌دار کلیهٔ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تشکیل پرگنه‌های بزرگ، صاف و گرد با همولیز دوگانه (همولیز کامل در ناحیه داخلی و همولیز ناقص در ناحیه بیرونی) ایجاد کردند. کلیه جدایه‌ها بر روی محیط‌های اختصاصیTSC و TSN، پرگنه‌های روشن کرم‌رنگ با هسته مرکزی تیره تولید کردند. بنابراین از مجموع ۱۵۰ نمونه بال، گردن، کبد (هر کدام ۵۰ نمونه) و ۳۰ نمونه سنگدان عرضه‌شده در مراکز فروش، به ترتیب ۲(۴٪)، ۱ (۲٪)، ۲ (۴ ٪) و ۱ (۳/۳۳٪) باکتری جدا گردید .

در آزمایش تعیین حساسیت ضدمیکربی مشاهده گردید که کلیه جدایه‌ها (۱۰۰٪) نسبت به اریترومایسین، جنتامایسین و کلوکساسیلین مقاومت نشان دادند. همچنین ۱۰۰ درصد جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالکسین، پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین حساس بودند (نمودار ۱).



شکل ۱: تصاویر مربوط به آنتی‌بیوگرام و جداسازی روی محیط آگار خون‌دار- قسمت A و B : نمونه نتایج آنتی‌بیوگرام و قسمت C : همولیز دو گانه ناشی از یک جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس*

بحث:

در ایران مطالعات اندکی برروی میزان آلودگی فراورده‌های غذایی طیور به *کلستریدیوم پرفرینجنس* و امکان انتقال سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها از طریق این مواد صورت گرفته است (۱۳). مطالعه حاضر به‌منظور بررسی میزان آلودگی بعضی از فراورده‌های طیور به باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی آنها صورت گرفت.

در مطالعه انجام‌شده توسط Hall و همکاران (۱۹۶۵) بر روی تعداد ۱۶۱ نمونه فراورده گوشتی شامل۲۶ نمونه مرغ (بال و پا و سینه و کبد مرغ)، ۵۰ نمونه گوشت گاو، ۱۷ نمونه گوشت گوساله، ۲۷ نمونه گوشت بره و۴۱ نمونه گوشت خوک، از ۱۱۳

نمونه باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس جداسازی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حدود ۵۸٪ از نمونه‌های مرغ، آلوده به *کلستریدیوم پرفرینجنس* بودند که نسبت به مطالعه حاضر از درصد بالاتری برخوردار بود. در این مطالعه، بیشترین میزان آلودگی در نمونه های گوشت گوساله و گاو دیده شد (۱۴). این تفاوت می تواند ناشی از نحوه نمونه‌گیری باشد، ضمن اینکه بیشترین میزان آلودگی مربوط به نمونه‌های گوشت قرمز بوده است.

در مطالعه انجام‌شده توسط Sperner و همکاران (۱۹۹۹)، تعداد ۱۲۱ نمونه گوشت مرغ و ماهی جمع‌آوری شد که در نهایت ۲۰٪ از نمونه‌ها از نظر وجود باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* مثبت شناخته شدند. در ۷۰٫۳٪ از نمونه‌ها *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A، ۱۲٫۶٪ تیپ B، ۹/۹ ٪ از نمونه‌ها تیپC و بقیه شامل تیپ‌هایD و E بودند (۱۵). در مطالعه‌ای مشابه توسط Wen و همکاران (۲۰۰۴) در آمریکا، ۶۴ نمونه بال و گردن و کبد مرغ مورد بررسی قرار گرفت که ۳۵٪ نمونه‌ها به *کلستریدیوم پرفرینجنس* آلوده بودند. انجام آزمایشPCR بر روی جدایه‌ها نشان داد که کلیه جدایه‌ها به تیپ A *کلستریدیوم پرفرینجنس* تعلق دارند (۱۶).

Martel و همکاران (۲۰۰۴) ، در مطالعه‌ای به بررسی تعیین میزان حساسیت ضدمیکربی *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از طیور گوشتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف با استفاده از روش حداقل غلظت مهاری پرداختند. در این مطالعه کلیه جدایه‌ها نسبت به ۶ آنتی‌بیوتیک مختلف شامل پنی‌سیلین، ونکومایسین، لینکومایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، نئومایسین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که کلیه جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد بررسی، از حساسیت بالایی نسبت به پنی‌سیلین (۷۹٫۵٪)، کلرامفنیکل (۸۲٪) و ونکومایسین (۸۹٪) برخوردار بودند، در حالی که جدایه‌ها حساسیت کمی نسبت به نئومایسین (۹٪)، لینکومایسین (۲۴٫۷٪) و تتراسایکلین (۹٪) داشتند که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد (۱۶).

هر چند امروزه روش‌های رقت‌سازی آگار و آبگوشت (تعیینMIC) جهت باکتری‌های بی‌هوازی با قابلیت اعتماد بالاتری نسبت به روش انتشار دیسک معرفی می‌گردند، اما، دشواری اجرایی روش تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) امروزه محققین را بر آن داشته تا جهت سهولت عملکرد آزمایشگاه‌های غیرتحقیقاتی و معمول، آنها را نسبت به انجام روش انتشار دیسک ترغیب نمایند(۲۰-۱۸). به‌همین دلیل در این مطالعه هم از روش انتشار دیسک که هم اکنون به‌طور معمول در آزمایشگاه‌های تشخیصی کشور انجام می پذیرد، استفاده گردید.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها و به ویژه *کلستریدیوم پرفرینجنس* راهنمای مناسبی برای استفاده صحیح از آنتی‌بیوتیک‌های موثر در مزارع پرورشی طیور است. انتقال باکتری‌های مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند برای جامعه انسانی‌ای که از مواد غذایی با منشاء طیور استفاده می‌کنند، تهدید محسوب شود. به‌نظر می‌رسد مطالعه کامل‌تری که زنجیره تولید تا مصرف را هدف قرار بدهد و بررسی جامع‌تری با تعداد نمونه بیشتر بر روی سایر فراورده‌های مرغ به ویژه فراورده‌ی منجمد از بابت حضور *کلستریدیوم پرفرینجنس* نیاز است. همچنین انجام مطالعات مشابه در رابطه با سایر فراورده‌های غذایی مانند گوشت و سایر فراورده‌های دامی و مقایسه نتایج با مطالعه حاضر، جهت تعیین عیار نقش آنها در جوامع انسانی در کشورمان لازم باشد .

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دکتر بهرام شجاع‌دوست به‌دلیل در اختیار قرار دادن سویه‌های استاندارد و آقای علی کارگر کارشناس آزمایشگاه بخش طیور و همچنین معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تامین مالی این پروژه به شماره ۲۲۱۲۵ ، تشکر و قدردانی می‌کنند.

References:

1-Miki Y, Miyamoto K, Fujiuchi K, Akimoto S. Prevalence and characterization of enterotoxingene-carrying Clostridium perfringens isolates from retail meat productsin Japan. Environ Microbiol. 2008;76:66-72.

2- Niilo L. Clostridium perfringens in Animal Disease: A Review of Current Knowledge. Can Vet J. 1980: 21: 141–148.

3-Justin N, Walker N, Bullifent HL, Songer G, Bueschel DM, Jost H. The first strain of Clostridium perfringens isolated from an avian source has an alpha-toxin with divergent structural and kinetic properties. Biochemistry. 2002;41:53-62.

4-Olkowski AA, WojnarowiczC,Chirino-Trejo M, Drew MD. Responses of broiler chickens orally challenged with Clostridium perfringens isolated from field cases of necrotic enteritis. Veterinary Science. 2006;81:99-108.

5-Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR. J ClinMicrobiol. 1997;35:228-232.

6-Novak JS, Juneja VK. Clostridium perfringens: hazards in new generation foods. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2002;3:127-132.

7-Alpho ns J, Cornelia W, Dirk J. A multiplex PCR for toxin typing of Clostridium perfringens isolates. Veterinary Microbiology 2009;136:411-412.

8-Sakurai J. Toxins of Clostridium perfringens. Rev Med Microbiol. 1995;6:175-185.

9-Petit L, Gibert M, Popoff MR. Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. Trends in Microbiology 1999;7:104-108.

10-Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. ClinMicrobiol Rev. 1996;9:216-234.

11-Keyburn AL, Sheedy SA, Ford ME, Williamson MM, Rood JI, Moore RJ. Alpha-toxin of Clostridium perfringens is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. Infect Immun. 2006;74:6496-6500.

12-LabbeR.G,Tweten RK. Clostridium perfringens beta-toxin and Clostridium septicum alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis. Vet Microbiol 2001;82:1-9.

13-Nikpiran H, Shojadoost B, Peighambari SM. Experimental induction of necrotic enteritis in broiler chickens by Clostridium perfringens isolates from the outbreaks in Iran. J Vet Res.2008;63:127–132.

14-Hall H.Robert A. Clostridium perfringens in Meat and Meat Products. Microbiology. 1965;13:352-357.

15-Sperner B, Schalch B, Eisgruber H, Stolle A. Molecular methods for the analysis of Clostridium perfringens relevant to food hygiene. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 1999;24:281-286.

16-Wen Q, McClane B. Detection of enterotoxigenic Clostridium perfringens type A isolates in American retail foods. Appl Environ Microbiol 2004;70: 85-91.

17-Martel A, Devriese L.A, Cauwerts K, De Gussem K, Decostere A, and HaesebrouckF.Susceptibility of clostridium perfringens strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. Avian pathology.2004; 33: 3-7.

18-Justesen U.S. Antibiotic resistance determination; dilution methods versus disc diffusion. The old story comes back. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious DiseasesECCMID) 31.03.2012 - 03.04.2012

19-Agnoletti F, Bacchin C, Bano L, Passera A, Favretti M and Mazzolini E. Antimicrobial susceptibility to zinc bacitracin of Clostridium perfringens of rabbit origin. World Rabbit Sci. 2007; 15:19-22.

20-Rahman MS, Sharma RK, Borah P, Chakraborty A, Devi Mandakini RK and Longjam N. Characterization of Clostridium perfringens isolated from mammals and birds from Guwahati city, India. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2012;18: 83-87