Investigation of *Clostridium perfringens* in inflamed wounds and gauze of the patients′ feet infected with diabetics

التحري عن بكتريا *Clostridium perfringens* في الجروح الملتهبة والشاش في اقدام مرضى السكري

[1] كوثر كاظم عطية القرعاوي [2] ا.د حميد مجيد رشيد العبيدي

جامعة الكوفة/ كلية الزراعة / قسم علوم الاغذية

البحث مستل

المستخلص

جمعت خلال الدراسة 100 عينة من قسم القدم السكري التابع لمستشفى مدينة الصدر الطبية للفترة من 16-5-2017الى 15-8- 2017. زرعت البكتريا اولا على وسط مرق الثايوكلايكوليت وباستعمال ظروف لاهوائية وعدة تحرير الغاز [Gas pak] بعدها تم زرع البكتريا على وسط Glucose-Blood agar اذ تم عزل [20]عزلة تعود لبكتريا *Clostridium perfringens* موزعة بين [19] عزلة من جروح اقدام مرضى السكري وعزلة واحدة من الشاش .من خلال الصفات الشكلية والفحوصات الزرعية والاختبارات الكيميوحيوية اثبت انها بكتريا *Clostridium perfringens* اذ تبين من خلال الفحص المجهري انها موجبة لصبغة كرام ذات شكل عصوي وغير متحركة لاهوائية مكونة للسبورات وسبوراتها ذات شكل بيضوي وموقع شبه طرفي عند تنميتها على وسط Litmus milk medium اعطت فحصا موجبا من خلال احداث التخمر العاصفي وغير منتجة لانزيم الكاتليز والاوكسديزCatalase and oxidase اذ اعطت فحصا سالبا واتضح انها موجبة لتحلل الجيلاتين اذ تبين ان لديها القدرة على افراز انزيم Gelatinase و تبين انها محللة للنشا من خلال افراز انزيم Amylase وقد تبين انها مخمره لسكر الكلوكوز دكستروز فركتوز لاكتوز وسكر الكالاكتوز بينما كانت غير مخمرة لسكر المانيتول والسالسين .

الكلمات المفتاحية: *Clostridium perfringens* ، الكانكرينا الغازية

Abstract

One hundred samples were collected during the study of diabetic foot section of Al-Sadr city hospital medical supplies for the period from 16/5/2017 to 15/8/2017. The bacteria were first grown on the medium of the thyoglycolate broth using anaerobic conditions and several liberalization of gas [Gas pak] were then grown bacteria on Glucose- Blood agar It has been isolated [20] Clostridium perfringens bacteria isolated belonged to distributed among [19] isolation of diabetic foot wounds and isolate one of the gauz. Through morphological and biochemical tests and culture media of proved it Clostridium perfringens as revealed through microscopic examination ,it is Gram positive with bacilli shape and non -motile anaerobic, spores forming more over the shapes of spores was oval sub-terminal. Bacteria were grown in Litmus Milk medium gave test positive through fermentation stormy. The results of biochemical tests showed they are unproductive enzyme Catalase and Oxidase as it gave a test negative and it turned out that it is positive for the degradation of gelatin as it shows that have the ability to secrete the enzyme Gelatinase. it also that is a starch hydrolysis through the secretion of the enzyme Amylase, Ferment glucose, dextrose, fructose, lactose and galactose while non- ferment mannitol and salicin.

Keywords: *Clostridium perfringens* ، gas gangrene

البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول

المقدمة

Clostridium perfringens بكتريا لاهوائية ¸مكونة للسبورات¸ عصوية الشكل ¸تظهر بشكل مفرد او مزدوج موجبة لصبغة كرام وغير منتجة لانزيم الكاتاليزابعادها تتراوح مابين 1.3-9.0 مايكروميتر طولا و0.6-2.4 مايكروميتر عرضا[1] .تصنف الى خمسة انواع [A-E] اعتمادا على انتاج اربعة انواع من الذيفانات الرئيسية التي تفرزها[α, β ,ε و ι] بالإضافة الى هذه الذيفانات يمكن ان تنتج 15 نوع من السموم والانزيمات خارج الخلية[3,2]. عزلت لاول مرة عام 1892 من نسيج مصاب بالكانكرينا وعرفت حينها باسم *Bacillus aerogenes capsulatus* [4] .بكتريا *Clostridium perfringens* واسعة الانتشار اذ تتواجد في الاغذية والقناة الهضمية من الانسان و الحيوانات وفي التربة والمناطق الملوثة بالبراز البشري والحيواني . [5] ينشا مرض الكانكرينا الغازية عندما تكون البكتريا على اتصال مباشر بالجروح المفتوحة متميزا بالانتشار السريع [6] .الذيفان المسؤول عن هذه الحالة هو ذيفان الفا المفرز من قبل البكتريا اذ يسبب تدهور الفوسفوتيديل كولين والاسفنكومايلين عند الدخول الى اغشية الخلية المضيفة مما يؤدي الى تلف الانسجة وتحلل خلايا الدم والخلايا البطانية[7] . يبدا ظهور الاعراض ببداية الم شديد ومفاجئ في المنطقة المصابة وتبدا بالانتفاخ وتصبح زرقاء اللون نتيجة تخثر الدم في الاوعية الدموية ونقص الاوكسجين [8].نظرا لما لهذه البكتريا من خطورة على حياة الانسان ولعدم وجود دراسة مسبقة لعزل هذه البكتريا من جروح اقدام مرضى السكري في محافظة النجف الاشرف ارتينا القيام بهذه الدراسة .

المواد وطرائق العمل

جمعت 100 عينة من قسم القدم السكري التابع لمستشفى مدينة الصدر الطبية للفترة الواقعة 2017/5/16 الى2017/8/15 موزعة من جروح اقدام مرضى السكري ومن الاشخاص المصابين بالكانكرينا والشاش المستعمل من قبل المريض لغرض عزل بكتريا *Clostridium perfringens* اذ اخذت العينات قبل العلاج بالمضادات الحيوية بواسطة مسحات قطنية معقمة حاوية على وسط ناقل جاهزSterile transport medium swab بعدها نقلت العينات الى المختبر لغرض اجراء العزل والتشخيص تم تنمية البكتريا اولا على وسط مرق الثايوكلايكوليت Thyoglycolate medium وحضنت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24ساعة تحت ظروف لا هوائية باستعمال اكياس توليد الغاز والحاوية اللاهوائية بعد انتهاء فترة الحضانة لقح وسط Glucose-Blood agar من النمو الظاهر في انابيب الثايوكلايكوليت وحضنت الاطباق تحت ظروف لاهوائية بدرجة حرارة 37م° بعد 24 ساعة تم انتخاب المستعمرات التي اعطت صفات بكتريا *Clostridium perfringens* واعادة الزرع على وسط Glucose-Blood agar لغرض التنقية وتمهيدا لعمل الاختبارات التاكيدية لتشخيص بكتريا *Clostridium perfringens* [8] شخصت البكتريا في مختبرات كلية الزراعة / جامعة الكوفة و بالاعتماد على الصفات الزرعية [الشكل ¸اللون والحجم] والفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية [تخمر السكريات ¸اختزال النترات ¸تفاعل حليب اللتموس ¸انتاج الكاتاليز] .

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج الدراسة الى و جود [20] عزلة عائدة لبكتريا *Clostridium perfringens* من مجموع [100]عزلة موزعة بواقع [19]عزلة من مجموع [100]عزلة وبنسبة 21.1. % مصدرها جروح اقدام مرضى السكري وعزلة واحدة من مجموع [10] عزلة وبنسبة 10 % مصدرها الشاش كما موضح في جدول [1]

جدول [1] يوضح مصادر واعداد عزلات بكتريا *Clostridium perfringens*

ت	موقع اخذ العينة	عدد العينات	اعداد البكتريا	نسبة عزلها من العينات الماخوذه منها
1	الجروح الملتهبة لمرضى السكري	90	19	%21.1
2	الشاش	10	1	%10
3	المجموع	100	20	%31.1

عند ظهور المستعمرات على وسط Glucose-Blood agar انتخبت المستعمرات المحاطة بمنطقتي تحلل الاولى داخلية ذات تحلل كامل [بيتا] والاخرى ذات تحلل جزئي [الفا] اذ لوحظ ان المستعمرات ظهرت بشكل دائري ملساء وذات لون بني وهذا يتطابق مع صفات مستعمرات بكتريا الكلوستريديوم [8] .

فحصت العزلات تحت المجهر اذ اعطت فحصا موجبا لصبغة كرام وباشكال عصوية سميكة ذات نهايات عريضة وتجمعات مفردة ومزدوجة كما اظهر الفحص ان البكتريا مكونة للسبورات وذات موقع شبة طرفي وهذا يتطابق مع ما ذكره[9] .

اعطت العزلات البالغ عددها 20 عزلة فحصا سالبا لانتاج انزيم الكاتاليز والاوكسديز نتيجة عدم ظهور الفقاعات الغازية عند اضافة مادة بيروكسيد الهيدروجين وايضا عدم تغير لون الكاشف الاوكسديزالى البنفسجي[9] .

اظهرت العزلات قدرتها على احداث ظاهرة التخمر العاصفي عند تنميتها على وسط حليب اللتموس اذ تحدث هذه الظاهرة نتيجة لتخمر سكر اللاكتوز مولدا حامض اللاكتيك الذي يعمل على ترسيب الكازين اذ يحصل التجبن الحامضي ومن حجم الغاز الناتج يندفع الراسب الى الاعلى مصحوبا بظهور فقاعات حولة مع تغير في لون الكاشف الى اللون الوردي اتفقت هذه النتيجه مع [8]

كما اعطت العزلات فحص موجب لتحليل الجيلاتين نتيجة لافراز البكتريا لانزيم Gelatinase [10] . واختزلت النترات الى النتريت نتيجة لتغير لون الوسط الى اللون البرتقالي عند اضافة الكاشف [11] .

اظهرت العزلات فحصا سالبا لاختبار الحركة وذلك عند الطعن على وسط Buffered motility nitrate اذ لم يشاهد حدوث انتشار للنمو خارج حدود خط الطعن [12].اظهرت العزلات المنتخبة فحصا موجبا لتحلل النشا اذ لوحظ عند اضافة كاشف اليود الى الاطباق الحاوية على مستعمرات البكتريا ظهور هاله شفافة حول المستعمرات نتيجة لافراز انزيم Amylase [12] .

وعند اجراء اختبار انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين اعطت جميع العزلات فحصا موجبا نتيجة تغير لون الوسط الى الاسود اذ يتفاعل غاز H_2S المنتج من قبل البكتريا مع الحديد الموجود بالوسط مولدا كبريتيد الحديدوز [8] .

اظهرت العزلات قدرتها على تخمر سكر(اللاكتوز ،كالاكتوز ،كلوكوز ،فركتوز ،مالتوز ،السكروز والدكستروز) نتيجة لتغير لون وسط تخمر السكريات الى اللون الاصفر وتكون غاز في انبوبة درهام بينما لم تخمر سكر المانيتول والسالسين[10] .وعند تنمية العزلات على وسط مح البيض اعطت فحصا موجبا لانتاج انزيم الليسثين وذلك بظهور هاله شفافة حول المستعمرات النامية على الوسط بينما كان بقية الوسط معتما [9].

المصادر

[1]-Dennison, A. C. ; Vanmetre, O. C. ; Morley, P. S. ; Callan, R. J. ; Plampin,E. C. and Ellis, R. P.(2005). Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in Vero production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left displaced abomasums. JAVAMA. 227 (1): 132-138.

[2]-Miyamoto, K. ; Li, J. and Mcclane, B .A. (2012). Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: Detection and Identification. Microbes Environ. Vol. 27, No. 4, 343–349, 2012.

[3]-Monma, C. ; Hatakeyama, K. ; Obata, H. ; Yokoyama, K. ; Konishi, N. ; Itoh, T. ; Kai, A. (2015). Four foodborne disease outbreaks caused by a new type of enterotoxinproducing *Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol 53:859 –867 doi:10.1128/JCM.02859-1421.

[4]-Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. Clin Microbiol. Rev. 3, 66–98.

[5]-Bryant, A. E.; Stevens, D. L.(2010). Clostridial myonecrosis: New insights in pathogenesis and management. Curr. Infect. Dis. Rep. 2010, 12, 383–391.

[6]-Sakurai, J. ; Nagahama, M. ; Oda, M. (2004). *Clostridium perfringens* alpha toxin:characterization and mode of action. J. Biochem.(Tokyo) 136: 569–574.

[7]-Li, J. ; Miyamoto, K. and McClane, B. A. (2007). Comparison of virulence plasmids among *Clostridium perfringens* type E isolates. Infect. Immun. , 75(4):1811-1819.

[8]-علي ، منعم رضوان ومحمد علي، سوسن ساجد و عبد الرزاق، اماني عبد الوهاب(2011). عزل وتشخيص بكتريا *Clostridium perfringens*من العينات السريرية وبيئة بعض مستشفيات بغداد والتحري عن عوامل ضراوتها. مجلة علوم المستنصرية . 22(4)37-55

[9] -علي ، منعم رضوان(2007) . دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Clostridium perfringens* المعزولة من العينات السريرية ومن بيئة بعض مستشفيات بغداد. اطروحة دكتوراه. قسم علوم الحياة. كلية العلوم. جامعة المستنصرية.

[10]- Luma Y. Mehdi. (2017). Isolation and Identification of *Clostridium perfringens* and its Enterotoxin in Food poisoning Patients. Journal of the Faculty of Medicine 59(2), 145-150.

[11]-Lee,Chi-An.(2016). Distribution of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* spores in U.S.retall spices.A thesis. Food Science. University of Massachusetts.

[12]-عيدان ، مصطفى عدنان(2017). عزل وتشخيص بكتريا التسمم البرفرنجي *Clostridium perfringens* من الاغذية في مدينة البصرة ودراسة خواصها وتحديد الجين المسؤول عن تسمم الغذاء . رسالة ماجستير.كلية الزراعة. جامعة البصرة.