University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 79, Number 1, 2024, 41-50

Identifying *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep of Kurdistan Province in Iran by Culture and Polymerase Chain Reaction and Determining the Antibiotic Resistance of its Isolates

Jamil Ataei Kileh Golan[1]✉, Safora Derakhshan[2]✉, Aram Sharifi[3]✉, Bahar Nayeri Fasaei[4]✉, Taghi Zahraei Salehi[4]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Liver and Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Kurdistan, Sanandaj, Iran*
[3] *Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran*
[4] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

Received: *21 October 2023*, ***Accepted:*** *24 December 2023*

10.22059/jvr.2023.356839.3332

Abstract

BACKGROUND: *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the etiological agent of caseous lymphadenitis (CLA), a chronic and very common disease in sheep and goats, which can lead to severe economic losses in the livestock industry.

OBJECTIVES: This study aims to investigate the prevalence of CLA in sheep in Kurdistan province of Iran using phenotypic and molecular methods, and assess the antibiotic resistance of isolated *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

METHODS: In this study, from September to March 2022, 270 samples of skin abscesses were collected from sheep in livestock farms of Kurdistan province. Immediately, using the cold chain system, the samples were transferred to the microbiology laboratory of the Faculty of Medicine at Kurdistan University of Medical Sciences. Identification of isolates was done using biochemical tests and polymerase chain reaction (PCR) method. The antibiotic resistance of the isolates was examined using the Kirby-Bauer disk diffusion method.

RESULTS: Based on biochemical tests, out of 270 samples, 82 suspected to have *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Out 82 samples, the presence of bacteria was confirmed in 76 samples by the PCR. The antibiotic sensitivity test showed that the isolates had high sensitivity to doxycycline and ceftriaxone and high resistance to streptomycin and kanamycin.

CONCLUSIONS: The CLA has a high prevalence in sheep in Kurdistan province. According to high resistance rate of *Corynebacterium pseudotuberculosis* to streptomycin and kanamycin, it recommended to avoid treatment of CLA cases with these antibiotics.

Keywords: Antibiotic resistance, Caseous lymphadenitis, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Polymerase chain reaction, Sheep

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Taghi Zahraei Salehi, Tel/Fax: +9821-61117052/+9821-66933222

How to cite this article:

Ataei Kileh Golan J, Derakhshan S, Sharifi A, Nayeri Fasaei B, Zahraei Salehi T. Identifying *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Sheep of Kurdistan Province in Iran by Culture and Polymerase Chain Reaction and Determining the Antibiotic Resistance of its Isolates. J Vet Res, 2024; 79(1): 41-50. doi: 10.22059/jvr.2023.356839.3332

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Results of antibiotic sensitivity test on *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates.
Figure 1. Colonies on blood agar plate.
Figure 2. Gram-stained slide (Gram-positive coccobacilli).
Figure 3. Electrophoresis image to identify the 16S rRNA gene of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Lane 1= Marker, lane 2= Negative control, lane 3= Positive control, lanes 4-15= Positive samples of *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی
دوره ۷۹، شماره ۱، ۱۴۰۳، ۵۰-۴۱

جداسازی و شناسایی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در گوسفندان استان کردستان با روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها

جمیل عطایی‌کیله‌گلان[۱]، صفورا درخشان[۲]، آرام شریفی[۳]، بهار نیری‌فسایی[۴]، تقی زهرایی‌صالحی[۴]

[۱] *دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۲] *مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کردستان، سنندج، ایران*
[۳] *گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران*
[۴] *گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۹ مهر ماه ۱۴۰۲، **تاریخ پذیرش:** ۳ دی ماه ۱۴۰۲
10.22059/jvr.2023.356839.3332

چکیده

زمینه مطالعه: *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*، عامل بیماری لنفادنیت کازئوز، بیماری مزمن و بسیار شایع در گوسفند و بز در سراسر جهان است که خسارت اقتصادی فراوانی به صنعت دامداری وارد می‌کند.

هدف: بررسی شیوع بیماری لنفادنیت کازئوز گوسفندان در استان کردستان، تعیین فراوانی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی و همچنین بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*، هدف مطالعه حاضر بود.

روش‌کار: در مطالعه حاضر، از شهریور تا اسفند ۱۴۰۰، ۲۷۰ نمونه از گره‌های لنفاوی درگیر گوسفندان از دامداری‌های سطح استان کردستان جمع‌آوری شد. بلافاصله نمونه‌ها با حفظ اصول زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی کردستان منتقل شدند. شناسایی جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR) انجام شد. همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار از دیسک (کربی ـ بائر) بررسی شد.

نتایج: از ۲۷۰ نمونه اخذشده، براساس آزمون‌های بیوشیمیایی ۸۲ جدایه باکتری مشکوک به *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* تشخیص داده شد. از این تعداد جدایه که با روش‌های بیوشیمیایی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* تشخیص داده شد، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۷۶ جدایه تأیید شد. همچنین بررسی میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد جدایه‌ها حساسیت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های داکسی سایکلین و سفتریاکسون و نسبت به استرپتومایسین و کانامایسین مقاومت بالایی داشتند.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیماری لنفادنیت کازئوز در گوسفندان استان کردستان شیوع بالایی دارد. بنابراین مطابق یافته‌ها پیشنهاد می‌شود باتوجه‌به مقاومت بالای جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* اخذشده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کانامایسین، از درمان با این آنتی‌بیوتیک‌ها اجتناب شود.

کلمات کلیدی: *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*، گوسفند، لنفادنیت کازئوز، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: تقی زهرایی‌صالحی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس، باسیل گرم مثبت، بدون اسپور، غیرمتحرک و داخل‌سلولی اختیاری است که بیماری لنفادنیت کازئوز در گوسفند و بز ایجاد می‌کند (۱). این بیماری با تشکیل آبسه در غدد لنفاوی، پوست و اندام‌های داخلی در گونه‌های

مختلف نشخوارکنندگان کوچک مشخص می‌شود (۲). همچنین *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* عامل عفونت‌های مزمن و بدون علائم بالینی مشخص در تعداد زیادی از سایر گونه‌های مختلف پستانداران، مانند گاو، اسب، لاما، آلپاکا، گاومیش یا حتی انسان است، اما گوسفند و بز گونه‌هایی می‌باشند که بیشتر توسط این میکروارگانیسم تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۳). بیماری در گوسفند در اکثر کشورهای پرورش‌دهنده گوسفند شایع است و می‌تواند بر تولید پشم، گوشت، شیر، کیفیت لاشه، پوست و باروری گله‌ها تأثیر منفی بگذارد (۳). بیماری لنفادنیت کازئوز در خاورمیانه شایع است و خسارت اقتصادی فراوانی به بار می‌آورد. در مصر تخمین زده شده است که لنفادنیت کازئوز سالانه خسارتی حدود ۱/۷۶ میلیون دلار را به صنعت گوشت وارد می‌کند (۴). در *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* براساس توانایی‌شان در احیای نیترات ۲ بیوتیپ شناسایی شده‌اند: بیووار اویس (عامل لنفدنیت کازئوز در بز و گوسفند) که قادر به احیای نیترات نیست و دیگری بیووار اکوئی (عامل لنفانژیت اولسراتیو در اسب و گاو و ورم پستان در گاومیش) که قادر به احیای نیترات می‌باشد (۲).

مطالعات اندکی جداسازی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* از انسان را گزارش کرده‌اند. عفونت‌های انسانی ناشی از *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* اغلب شبیه عفونت‌های مشاهده‌شده در گوسفند و بز است. این عفونت‌ها معمولاً به برداشتن غدد لنفاوی عفونی همراه با درمان مکمل ضدمیکروبی نیاز دارند. این بیماری معمولاً پس از تماس نزدیک با حیوان آلوده ایجاد می‌شود و هیچ بیماری زمینه‌ای یا شرایط مستعدکننده‌ای در بیماران آلوده شناسایی نشده است (۵). اولین مورد ابتلا در سال ۱۹۹۶ از یک مرد در پاناما گزارش شد. مورد دیگر از یک بیمار مبتلا به پنومونی در ایالات متحده آمریکا گزارش شد. بیشترین موارد ابتلای انسان به لنفادنیت، از استرالیا گزارش شده است (۶). لنفادنیت کازئوز دارای ۲ فرم سطحی و احشایی با تظاهرات بالینی کاملاً متمایز است (۷). نوع ضایعات *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* پیوگرانولوماتوزی است و می‌تواند در اندام‌های مختلف ایجاد شود. بیماری با تشکیل آبسه در غدد لنفاوی سطحی و احشایی مشخص می‌شود. عفونت می‌تواند به اندام‌های داخلی مختلف، مانند ریه‌ها یا کبد سرایت کند و درنتیجه شکل احشایی بیماری ایجاد شود (۳). انتقال در درجه اول پس از عفونت زخم‌های سطحی پوست با چرک ناشی از آبسه‌هایی که خودبه‌خود تخلیه می‌شوند، اتفاق می‌افتد (۳). عوامل حدت اصلی این میکروارگانیسم یک اگزوتوکسین قوی به نام فسفولیپاز D (PLD) و دیواره سلولی غنی اسید مایکولیک می‌باشند (۸). اگزوتوکسین pld، نفوذپذیری عروقی را از طریق هیدرولیز پیوندهای استری در اسفنگومیلین غشای سلول پستانداران افزایش می‌دهد و باعث انتشار باکتری می‌شود. اسید مایکولیک باکتری را قادر می‌سازد برای مدت طولانی در محیط زنده بماند (۲). تداوم حضور *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در داخل سلول، درمان لنفادنیت کازئوز را دشوار می‌کند، زیرا تشخیص حیوانات آلوده تا حدودی دشوار بوده و درمان دارویی تأثیر کمی دارد. طبق یک توافق کلی موارد لنفادنیت کازئوز بالینی، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند (۹). علی‌رغم حساسیت آزمایشگاهی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* تقریباً به همه آنتی‌بیوتیک‌های رایج، اثربخشی درمان آنتی‌بیوتیکی در داخل بدن به‌دلیل ماهیت درون‌سلولی ارگانیسم و دیواره‌های ضخیم آبسه‌ها متغیر است. شکست درمان ممکن است نتیجه ناتوانی در دریافت غلظت کافی آنتی‌بیوتیک در محل عفونت باشد. برای درمان بیماری لنفادنیت کازئوز، معمولاً از پنی‌سیلین پروکائین، پنی‌سیلین پتاسیم، اریترومایسین یا تری متوپریم ـ سولفامتوکسازول استفاده می‌شود (۹). Senturk و Temizel در سال ۲۰۰۶، لنفادنیت کازئوز در گوسفند را با ترکیب آنتی‌بیوتیک‌های ریفامایسین و اکسی تتراسایکلین درمان کردند (۱۰). در ایران درمورد شیوع بیماری لنفادنیت کازئوز مطالعات کمی انجام شده است. در مطالعاتی که بین سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۲ در استان‌های فارس، کرمان، اصفهان، ارومیه و تبریز انجام شده است، شیوع *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* بین ۱۲/۶ تا ۸۵/۷ درصد گزارش شده است (۱۱-۱۵). ازآنجاکه مطالعه‌ای در سطح استان کردستان، در ارتباط با شیوع بیماری لنفادنیت کازئوز انجام نشده بود، هدف از مطالعه حاضر بررسی شیوع بیماری لنفادنیت کازئوز در استان کردستان، شناسایی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد بیماری با روش‌های فنوتیپی و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و همچنین بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها با روش انتشار از دیسک بود.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: در مطالعه حاضر، از شهریور تا اسفند سال ۱۴۰۰، ۲۷۰ نمونه از گره‌های لنفاوی درگیر گوسفندان از دامداری‌های سطح استان کردستان جمع‌آوری شدند. ابتدا سطح گره لنفاوی با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد و بعد از تراشیدن موهای محل گره لنفاوی، با استفاده از سرنگ استریل ۳ میلی‌لیتر چرک، جمع‌آوری شد و در مواردی که چرک حالت پنیری داشت

و با سرنگ قابل برداشت نبود، سطح آبسه‌ها با تیغ جراحی برش داده شد و نمونه چرک در لوله‌های آزمایش جمع‌آوری گردید. بلافاصله نمونه‌ها با حفظ اصول زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی کردستان منتقل شدند.

کشت و جداسازی: ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت آبگوشت برین هارت (BHIB) (مرک ـ آلمان) کشت داده شدند و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس نمونه‌ها در محیط‌های کشت ژلوز خوندار و مک‌کانکی (مرک ـ آلمان) کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در شرایط هوازی و خالص‌سازی پرگنه‌های مشکوک، ابتدا گسترش تهیه شد و پس از آن شکل و آرایش باکتری‌ها زیر میکروسکوپ و با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شد. سپس از آزمون‌های بیوشیمیایی، کاتالاز، نیترات، ژلاتین، اوره‌آز و تخمیر قندها (گلوکز، سوکروز، لاکتوز، مالتوز، زایلوز) و آزمون کمپ با *رودوکوکوس اکوئی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* جهت تأیید جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* استفاده شد (۱۶).

استخراج DNA و آزمون PCR: جدایه‌های تأییدشده به روش بیوشیمیایی، در محیط آبگوشت برین هارت (مرک ـ آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری رشدیافته سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست‌آمده با استفاده از سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد و سپس از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناکلون برای استخراج DNA براساس دستورالعمل کیت (EX6082) استفاده شد. برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از مسترمیکس‌های آماده ساخت شرکت سیناکلون، ایران (Cat. No: MM2062) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر، با استفاده از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس آماده، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۵ میکرولیتر آب‌مقطر، انجام شد. PCR با آغازگر ۱۶S، با توالی F: ACCGCACTTTAGTGTGTGTG و R: TCTCTACGCCGATCTTGTAT (۱۷) و برنامه دمایی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به این صورت بود: دمای ۹۴ درجه به‌مدت ۵ دقیقه (واسرشت اولیه) و ۳۵ سیکل به‌صورت ۹۵ درجه به‌مدت ۶۰ ثانیه واسرشت، ۵۷ درجه به‌مدت ۶۰ ثانیه اتصال و ۷۲ درجه به‌مدت ۶۰ ثانیه گسترش انجام شد. درنهایت مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه صورت گرفت (۱۷). جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دستگاه ترموسیکلر (Analytic Jena, Germany) استفاده شد. محصول به‌دست‌آمده در ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی‌شده با رنگ safe stain با ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت ۶۰ دقیقه در بافر Tris Acetate EDTA(TAE) 1X الکتروفورز شد. از مارکر ۱۰۰ جفت‌باز (سیناکلون، ایران) (Cat. No. SL7041)، جهت تأیید اندازه باندهای حاصل استفاده و تصویر ژل در دستگاه ترانس ایلومیناتور شرکت بیو راد آلمان (Bio-Rad-Germany) مشاهده شد. از سویه مثبت *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* تهیه‌شده از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به‌عنوان کنترل مثبت و آب‌مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن: الگوی حساسیت ضدمیکروبی جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* با استفاده از روش دیسک دیفیوژن (کربی‌ـبائر) و براساس دستورالعمل CLSI 2021 تعیین شدند (۱۸). حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، لینکومایسین (۵ میکروگرم)، تایلوزین (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، داکسی سایکلین (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، (پادتن طب، کرج) بررسی شد. به این ترتیب که پرگنه‌های خالص در ۵ میلی‌لیتر از محیط نوترینت براث (مرک ـ آلمان) تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند تا کدورت لازم مشاهده شود و سپس با استاندارد نیم مک‌فارلند مقایسه شدند. جدایه‌ها با استفاده از سوآب استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک ـ آلمان) حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند به‌صورت سطحی کشت داده شدند و پس از خشک شدن سطح پلیت‌ها، دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک با استفاده از پنس استریل روی پلیت‌ها قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از این مدت، قطر هاله‌های عدم رشد، اندازه‌گیری و نتایج با کمک جدول Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2021) تفسیر شدند. همچنین از سویه‌های استاندارد باکتری‌های استافیلوکوک و استرپتوکوک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۸).

جدول ۱. نتایج آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*.

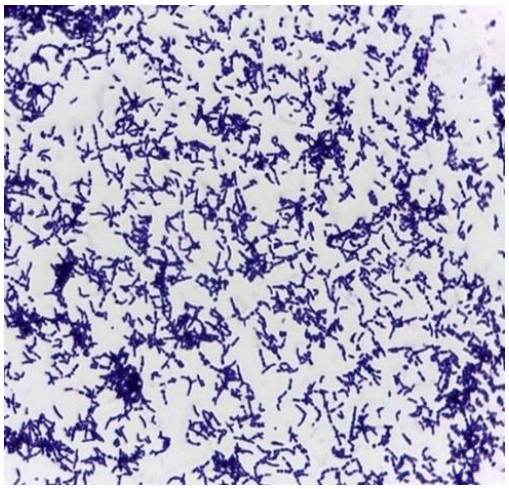
آنتی‌بیوتیک	تعداد (درصد)		
	حساس	نیمه‌حساس	مقاوم
انروفلوکساسین	۵۶(۷۳/۶)	۹(۱۱/۸)	۱۱(۱۴/۴)
تایلوزین	۴۷(۶۱/۸)	۸(۱۰/۵)	۲۱(۲۷/۶)
استرپتومایسین	۰(۰)	۰(۰)	۷۶(۱۰۰)
لینکومایسین	۶۲(۸۱/۵)	۶(۷/۸)	۸(۱۰/۵)
آموکسی‌سیلین	۵۸(۷۶/۳)	۰(۰)	۱۸(۲۳/۶)
اریترومایسین	۶۸(۸۹/۴)	۲(۲/۶)	۶(۷/۸)
سفتریاکسون	۶۹(۹۰/۷)	۰(۰)	۷(۹/۲)
کاناماسین	۲۶(۳۴/۲)	۱۰(۱۳ /۱)	۴۰(۵۲/۶)
داکسی سایکلین	۷۳(۹۶/۰۵)	۰(۰)	۳(۳/۹)
سفوتاکسیم	۵۶(۷۳/۶)	۰(۰)	۲۰(۲۶/۳)

تصویر ۱. کلنی‌ها بر روی پلیت بلاد آگار.

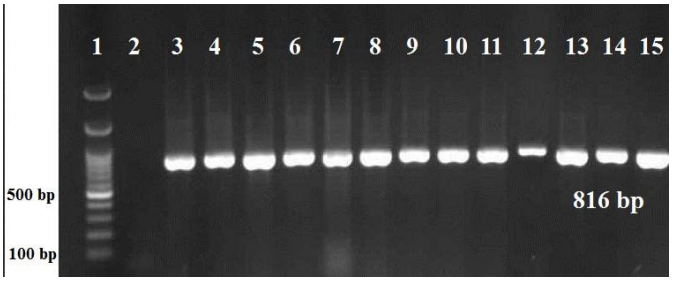
نتایج

شناسایی جدایه‌ها: بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی، کلنی‌های مشکوک به *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* با ظاهر مایل به سفید، خشک، مات، محدب و با همولیز نازک بتا، خالص‌سازی شدند. سپس برای تعیین هویت جدایه‌ها، از آزمون‌های بیوشیمیایی، کاتالاز، نیترات، ژلاتین، اوره‌آز و تخمیر قندها (گلوکز، سوکروز، لاکتوز، مالتوز، زایلوز) استفاده شد. از ۲۷۰ نمونه موردبررسی، در ۸۲ نمونه، کلنی‌های مشکوک به *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* شناسایی و جداسازی شدند. نتایج به دست آمده برای جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* عبارت بودند از: کاتالاز مثبت، اوره‌آز مثبت، غیراحیاکننده نیترات، تقویت‌کننده همولیز رودوکوکوس *اکوئی* ($CAMP^+$)، ممانعت‌کننده همولیز *استافیلوکوکوس اورئوس* ($CAMP^-$)، تخمیرکننده قندهای گلوکز و مالتوز و غیرتخمیرکننده سوکروز، مالتوز و زایلوز، غیرمتحرک و ژلاتین منفی.. منظره رشد *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در محیط ژلوز خون‌دار بعد از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در تصویر ۱ و همچنین گسترش رنگ‌آمیزی‌شده *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در تصویر ۲ نشان داده شده است.

نتایج PCR نشان داد از ۸۲ جدایه که با واکنش‌های بیوشیمیایی، *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* تشخیص داده شده بودند، ۷۶ نمونه، واجد قطعه‌ای به وزن مولکولی ۸۱۶ جفت باز می‌باشند. در تصویر ۳ الکتروفورز محصول PCR تعدادی از جدایه‌ها ارائه شده است، نتایج تعیین توالی یکی از جدایه‌ها در بانک ژن با شماره OQ552881 ثبت شد.



تصویر ۲. لام رنگ‌آمیزی‌شده با روش گرم (کوکوباسیل‌های گرم مثبت پلی مورف).



تصویر ۳. نتایج الکتروفورز برای شناسایی ژن *16S rRNA* *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*. لاین ۱: مارکر، لاین ۲: کنترل منفی، لاین ۳: کنترل مثبت، لاین‌های ۴ تا ۱۵ نمونه‌های مثبت *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*.

نتایج آزمایش حساسیت ضدمیکروبی: نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* حساسیت بالایی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. چنانکه در جدول ۱ قابل مشاهده است، حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های داکسی سایکلین، سفتریاکسون، اریترومایسین، لینکومایسین، آموکسی‌سیلین، انروفلوکساسین، سفوتاکسیم و تایلوزین به‌ترتیب ۹۶/۰۵ درصد، ۹۰/۷ درصد، ۸۹/۴ درصد، ۸۱/۵ درصد، ۷۶/۳ درصد، ۷۳/۶ درصد، ۷۳/۶ درصد و ۶۱/۸ درصد بود. جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کانامایسین به‌ترتیب ۱۰۰ درصد و ۵۲/۶ درصد مقاومت نشان دادند.

بحث

لنفادنیت کازئوز، یک بیماری مزمن مهم ازنظر دامپزشکی است که باعث بیماری در گوسفند و بز می‌شود و خسارات اقتصادی زیادی را به صنعت دامداری در سرتاسر جهان وارد می‌کند (۱۱). لنفادنیت کازئوز در اکثر مناطق دارای پرورش گوسفند در سراسر جهان گزارش شده است. مشکل عمده در کشورهای دارای پرورش نشخوارکنندگان کوچک، مانند استرالیا و نیوزلند است که از طریق کاهش تولید پشم، گوشت و شیر باعث زیان اقتصادی قابل‌توجهی در گله‌های گوسفند و بز می‌شود. براساس مطالعات قبلی، میانگین شیوع لنفادنیت کازئوز، در استرالیا، ۲۶ درصد، در پرتغال، ۳۴ درصد، در برزیل،۴۳/۷ درصد و در کانادا، ۲۱ درصد، گزارش شده است (۷، ۸).

براساس نتایج مطالعه حاضر از ۲۷۰ نمونه از گره‌های لنفاوی درگیر گوسفندان مورد بررسی، بر اساس کشت، ۸۲ جدایه (۳۰/۳ درصد) مشکوک به *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلورزیس* جداسازی و شناسایی شدند که با روش PCR، ۷۶ جدایه (۲۸/۱ درصد)، *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* تأیید شد. بنابراین نتایج مطالعه حاضر نشان داد *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد تورم گره‌های لنفاوی گوسفند مطرح است. نتایج مطالعه حاضر با مطالعات Arab و همکاران در سال ۲۰۱۳، Al-ggabary و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مصر، Abebe و Sisay در سال ۲۰۱۵ در اتیوپی که شیوع *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* را به‌ترتیب ۲۶/۳ درصد، ۲۲/۱۰ درصد و ۲۴/۴ درصد گزارش کردند، هم‌خوانی دارد (۱۹-۲۱). در مطالعه حاضر از PCR نیز برای شناسایی ژن کدکننده *16S rRNA*

به‌منظور تأیید تشخیص سویه‌های جداشده استفاده شد. ژن کدکننده *16S rRNA*، ژن انتخابی برای اکثر مطالعات تاکسونومی میکروبی است. بنابراین این ژن برای ارزیابی شیوع *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در حیوانات موردمطالعه مفید است (۱۷). نتایج مطالعه حاضر با نتایج برخی مطالعات دیگر، مانند Zamprogna و همکاران در سال ۲۰۲۰، Algammal در سال ۲۰۱۶ و Ilhan در سال ۲۰۱۳ که شیوع *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* را به‌ترتیب، ۴۳/۷۵ درصد، ۴۳/۸ درصد و ۵۷/۸ درصد گزارش کردند، مطابقت نداشت (۱۷، ۲۲، ۲۳). این تفاوت می‌تواند به‌دلیل تنوع منطقه جغرافیایی، نوع پرورش و نژاد حیوانات باشد (۲۴). تفاوت در سیستم‌های مدیریتی و شرایط آب‌وهوایی در هر منطقه، ازجمله دمای محیط، زنده ماندن *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در محیط را تا حد زیادی تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۰). از سوی دیگر تنوع در سویه‌های محلی ارگانیسم و یا تنوع نژاد گوسفند ممکن است تفاوت‌ها در شیوع بیماری را باعث شود. به این ترتیب که برخی نژادها نسبت به بیماری حساسیت بالاتری دارند (۲۱). به‌دلیل سیستم پرورش سنتی در استان کردستان و اینکه ازلحاظ آب‌وهوایی این استان جزء مناطق سردسیر کشور است و گوسفندان حدود ۶ ماه در فضای سربسته نگهداری می‌شوند و در تماس نزدیک با یکدیگر می‌باشند و همچنین در زمان پشم‌چینی از روش‌های سنتی استفاده می‌شود، امکان برش و ایجاد زخم وجود دارد. این دلایل باعث انتقال آلودگی به گوسفندان و شیوع بیماری می‌شود (۲۵). همه نمونه‌های اخذشده در مطالعه حاضر از ضایعات خارجی بود. درحالی‌که در بسیاری از مطالعات از ضایعات داخلی و در زمان کشتار نمونه‌گیری انجام شده بود (۱۴، ۱۵، ۲۱، ۲۲). دلایل مختلفی در ایجاد عفونت و انتقال *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در برخی از مزارع پرورش گوسفند وجود دارد که شامل این موارد می‌شود: شکست قرنطینه که به معرفی دام‌های با عامل بیماری‌زا به گله منجر می‌شود، مقاومت بالا در برابر عوامل محیط خارجی و مسیرهای متعدد عفونت *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* که باعث گسترش این پاتوژن می‌شود. چرای دام‌ها در فضای باز باعث ایجاد زخم‌های پوستی می‌شود و شرایط را برای ورود باکتری و ایجاد عفونت فراهم می‌کند. همچنین عدم آگاهی دامدار از این بیماری اجازه می‌دهد آبسه‌ها به‌خودی‌خود سرباز کنند و پاتوژن را در محیط پخش نمایند (۲۶). پاتوژن مورد مطالعه، از طریق ترومای پوستی ناشی از برش، نصب پلاک‌های گوش، اخته کردن، همچنین از طریق بلع، تماس مستقیم با آئروسل منتقل می‌شود و غشاهای مخاطی و زخم‌ها را آلوده می‌کند. *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* برای چندین ماه در محیط زنده می‌ماند. ماهیت درون‌سلولی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* در سلول‌های فاگوسیتی، مقاومت محیطی ارگانیسم و رفتار عدم پاسخ پاتوژن به عوامل ضدمیکروبی ازجمله فاکتورهایی می‌باشند که احتمالاً در تداوم مزمن بیماری در گله‌ها نقش دارند و به اتخاذ تدابیر ایمنی زیستی جدی برای پیشگیری و کنترل بیماری نیاز دارند (۲۲). ازاین‌رو معدوم کردن حیوانات بیمار، ضدعفونی کردن وسایل پشم‌چینی و سایر ابزارها، حذف خطرات موجود در محیط که ممکن است باعث آسیب‌های پوستی شود، معاینه دوره‌ای بالینی و آزمایشگاهی حیوانات مشکوک، قرنطینه حیوانات جدید قبل از معرفی به مزارع، واکسیناسیون و یا ایجاد رابطه دامپزشک ـ مالک ـ حیوان برای پیشگیری و کنترل لنفادنیت کازئوز در گله الزامی است (۲۲).

آزمایش حساسیت ضدمیکروبی نشان داد جدایه‌ها، بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های داکسی سایکلین، سفتریاکسون، اریترومایسین، لینکومایسین، آموکسی‌سیلین، انروفلوکساسین، سفوتاکسیم و تایلوزین به‌ترتیب با ۹۶/۰۵، ۹۰/۷، ۸۹/۴، ۸۱/۵، ۷۶/۳، ۷۳/۶ و ۶۱/۸ درصد و بیشترین مقاومت را نسبت به استرپتومایسین و کانامایسین به‌ترتیب با ۱۰۰ درصد و ۵۲/۶ درصد دارند. در مطالعه حاضر، جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* به غیر از کانامایسین و استرپتومایسین نسبت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت نشان دادند. اکثر مطالعات درمورد حساسیت ضدمیکروبی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*، تفاوت‌های منطقه‌ای را در شیوع سویه‌های غیرحساس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده‌اند (۲۱، ۲۵، ۲۷، ۲۸). این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از الزامات متفاوت برای انتخاب آنتی‌بیوتیک‌ها باشد که اغلب در هر کشور استفاده می‌شود (۲۹).

Connor و همکاران در سال ۲۰۰۷، با بررسی ۴۲ جدایه *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*، مشاهده کردند که جدایه‌ها، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کلرآمفنیکل، داکسی سایکلین، انروفلوکساسین، اریترومایسین، لینکومایسین، ریفامپین، اسپکتینومایسین، تتراسایکلین و تایلوزین کاملاً حساس، اما نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، کانامایسین و استرپتومایسین حساسیت متغیری دارند (۲۵). در مطالعه Gallardo و همکاران در سال ۲۰۱۹، جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سفوتاکسیم، سفوکستین، سیپروفلوکساسین، کلرآمفنیکل، اریترومایسین، استرپتومایسین، جنتامایسین، ایمی‌پنم، کانامایسین، نورفلوکساسین، پنی‌سیلین، ریفامپین، تتراسایکلین، تری‌متوپریم ـ سولفامتوکسازول، ونکومایسین و آموکسی‌سیلین ـ کلاولونیک اسید، ۱۰۰ درصد حساسیت نشان داده‌اند (۲۶).

در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۶، حساسیت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، نئومایسین و استرپتومایسین و مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و اریترومایسین مشاهده شده است (۲۳).

Li و همکاران در سال ۲۰۱۸، با بررسی مقاومت جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* مشاهده کردند که جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرآمفنیکل، لینکومایسین، ونکومایسین، تتراسایکلین، نورفلوکساسین، آموکسی‌سیلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، سفتریاکسون و سفوتاکسیم، حساس و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نیتروفورانتوئین و فورازولیدون، ۱۰۰ درصد مقاومت نشان داده‌اند (۲۷).

نکته حائز اهمیت در مطالعه حاضر، مقاومت بسیار بالای جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بود که این می‌تواند به‌دلیل استفاده بی‌رویه از این آنتی‌بیوتیک برای درمان بیماری لنفادنیت کازئوز در مزارع پرورش گوسفند در سطح استان باشد که باعث ایجاد مقاومت بالا به این آنتی‌بیوتیک شده است.

اگرچه آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد جدایه‌های *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس*، در شرایط آزمایشگاهی کاملاً به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده حساس می‌باشد، لنفادنیت کازئوز ممکن است همچنان یک مشکل جدی برای مزارع پرورش گوسفند و بز باشد، زیرا آنتی‌بیوتیک‌ها در داخل بدن قادر به نفوذ به کپسول ضخیم آبسه‌ها نمی‌باشند.

لنفادنیت کازئوز معمولاً به درمان جواب نمی‌دهد. درمان آنتی‌بیوتیکی به‌طورکلی مؤثر نمی‌باشند، زیرا آنتی‌بیوتیک‌ها قادر به نفوذ به ضایعات کپسول‌دار بیماری نمی‌باشند. بهترین راه برای کنترل این عفونت در گله حذف حیواناتی است که علائم بالینی را با تأیید تشخیص *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* نشان می‌دهند (۲۸). با در نظر گرفتن *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* به‌عنوان یک عامل مشترک بین انسان و دام، عدم حساسیت نسبت به مواد ضدمیکروبی می‌تواند یک مشکل جدی برای سلامت عمومی باشد (۲۹).

مطالعات در مقیاس بزرگتر جهت برآورد میزان دقیق‌تر شیوع بیماری، استفاده از روش‌های پیشگیرانه، شامل آموزش دامداران برای استفاده از ابزار و وسایلی که در زمان پشم‌چینی گوسفندان کمترین خراش و زخم را روی بدن ایجاد کند، مبارزه با انگل‌های خارجی جهت جلوگیری از انتقال باکتری توسط آن‌ها و مطالعات بر روی اجزای *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* که قادر به تحریک سیستم ایمنی می‌باشند، در راستای طراحی و تولید واکسن برای این بیماری پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی: در مطالعه حاضر، فراوانی *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* ۲۸/۱ درصد برآورد شد. جدایه‌ها، کمترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های داکسی سایکلین و اریترومایسین به‌ترتیب با ۳/۹ و ۷/۸ درصد و بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کانامایسین به‌ترتیب با ۱۰۰ و ۵۲/۶ درصد نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر حاکی از حضور *کورینه‌باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* به‌عنوان یکی از عوامل ایجادکننده آبسه‌های جلدی در گوسفندان و عامل شیوع بیماری لنفادنیت کازئوز در سطح استان می‌باشد. باتوجه‌به خسارات اقتصادی بسیار بالای این بیماری، اقدامات احتیاطی لازم ازجمله، توسعه برنامه‌های مؤثر واکسیناسیون، حذف دام‌های آلوده یا استراتژی‌های کنترلی جایگزین باید اتخاذ شود. مطالعات اپیدمیولوژیک در مقیاس بزرگ به‌منظور ارزیابی شیوع لنفادنیت کازئوز هم در سطح گله و هم دام و به‌دست آوردن داده‌های کمّی درمورد اهمیت اقتصادی بیماری لنفادنیت کازئوز در نشخوارکنندگان کوچک در ایران نیاز است.

سپاسگزاری

نویسندگان مطالعه حاضر از اعضای محترم گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی کردستان و همچنین گروه میکروبیولوژی ـ ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران که در کلیه مراحل این مطالعه ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Hussain R, Khaliq S.A, Siddique A.B, Khan I.A, Hassan M.F, Younus M. Clinico-pathological and bacteriological studies on caseous lymphadenitis in small ruminants. Pak J Agri Sci. 2017;54:437–44.

2. Schlicher J, Schmitt S, Stevens M.J.A, Stephan R, Ghielmetti G. Molecular Characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Isolated over a 15-Year Period in Switzerland. Vet Sci. 2021;8(8):151. doi: 10.3390/vetsci8080151 PMID: 34437473

3. Ruiz H, Ferrer L.M, Ramos J.J, Baselga C, Alzuguren O, Tejedor M.T, et al. The prevalence of caseous lymphadenitis as a cause of culling in adult sheep. Animals. 2020;10(11):1962. doi: 10.3390/ani10111962 PMID: 33114458

4. Osman A.Y, Nordin M.L, Kadir A.A, Saharee A.A. The epidemiology and pathophysiology of caseous lymphadenitis: A review. J Vet Med Res; 2018;5(3):1129.

5. Torres L.D.F.C, Ribeiro D, Hiratajr R, Pacheco L.G.C, Souza M.C, Santos L.S.D, et al. Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium spp* with zoonotic potential and an overview of human and animal infections. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(3):272-279. doi: 10.1590/S0074-02762013000300003 PMID: 23778659

6. Peel M.M, Palmer G.G, Stacpoole A.M, Kerr T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. Clin Infect Dis. 1997;24(2):185-191. doi: 10.1093/clinids/24.2.185 PMID: 9114145

7. Lacasta D, Fernández A, González J.M, Ramos J.J, Ortín A, Ferrer L.M. Gangrenous pneumonia, ovine respiratory complex and visceral form of caseous lymphadenitis: Relevance in lower respiratory tract disorders of adult sheep. Small Rumin Res. 2019;180:100-105. doi: 10.1016/j.smallrumres.2019.08.004

8. Alves J.R.A, de Farias A.E.M, de Souza Lima G.M, Limeira C.H, Alves F.S.F, Pinheiro R.R, et al. Seroprevalence of caseous lymphadenitis in goats sold in an animal fair in the northeastern semi-arid region of Brazil. Semina: Cienc Agrar. 2018;39(3):1067-1075. doi: 10.5433/1679-0359.2018v39n3p1067

9. Baird G. Treatment of ovine caseous lymphadenitis. Vet Rec. 2006;159(15):500. doi: 10.1136/vr.159.15.500 PMID: 17028258

10. Senturk S, Temizel M. Clinical efficacy of rifamycin SV combined with oxytetracycline in the treatment of caseous lymphadenitis in sheep. Vet Rec. 2006;159(7):216-217. doi: 10.1136/vr.159.7.216 PMID: 16905739

11. Hossein zadeh S, Haghkhah M, Shekarforosh Sh, Zehtab H. A Bacteriological Survey of Caseous Lymphadenitis in Sheep Slaughtered at the Fars lndusterial Meat Complex Abattoir. Vet Res Bio Pro. 1996;35(4):2-15. doi: 10.22092/vj.1995.112626 (In Persian).

12. Ghanbarpour R, Derakhshanifar A, Ghorbanpour najafabadi M, Sami M. A study on caseous lymphadenitis and its frequency in sheep slaughtered in kerman abattoir. Iran J Vet Res. 2003;3(1):46-52.

13. Shakerian A, Shekarforoush S, Sharifzadeh A, Keyvanmanesh M. A bacteriological survey of caseous lymphadenintis and its prevalence in sheep at the Isfahan slaughter house. J Comp Path. 2005;2(1):45-52. (In Persian).

14. Yosefbaigy G, Ounagh A.G, Nasirollahi A. Bacteriological study of caseous lymphadenitis in pre-scapular lymph nodes of sheep slaughtered in Urmia, northwestern Iran. Iran J Vet Res. 2004;5(2):63-66.

15. Zavoshti F.R, Khoojine A.B.S, Helan J.A, Hassanzadeh B, Heydari A.A. Frequency of caseous lymphadenitis (CLA) in sheep slaughtered in an abattoir in Tabriz: comparison of bacterial culture and pathological study. Comp Clin Path. 2012;21(5):667-671. doi: 10.1007/s00580-010-1154-7 PMID: 23049493

16. Quinn P.J, Markey B.K, Leonard F.C, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick E. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. 2nd ed. John Wiley, Sons. New Jersey, USA; 2011.

17. Ilhan Z. Detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from sheep lymph nodes by PCR. Rev Med Vet. 2013;164(2):60-66. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00089-5

18. Humphries R, Bobenchik A.M, Hindler J.A, Schuetz A.N. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. J Clin Microbiol. 2021;59(12):e00213-21. doi: 10.1128/jcm.00213-21 PMID: 34550809

19. Hatem M.E, Arab R.H, Ata S.N, El-Moez S.I.A, Khairy E.A, Fouad E.A. Bacterial abscessationin in sheep and goat in Giza governorate with full antibiogram screening. Glob Vet. 2013;10(4):372-381.

20. Al-Gaabary M.H, Osman S.A, Oreiby A.F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. Small Rumin Res. 2009;87(1-3):116-121. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.10.008

21. Abebe D, Sisay Tessema T. Determination of *Corynebacterium pseudotuberculosis* prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of isolates from lymph nodes of sheep and goats at an organic export abattoir, Modjo, Ethiopia. Lett Appl Microbiol. 2015;61(5):469-476. doi: 10.1111/lam.12482 PMID: 26280351

22. de Oliveira Zamprogna T, Ribeiro D, Azevedo V.A, Lara G.H.B, Motta R.G, da Silva R.C, et al. Bacteriological, cytological, and molecular investigation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *mycobacteria*, and other bacteria in caseous lymphadenitis and healthy lymph nodes of slaughtered sheep. Braz J Microbiol. 2021;52(1):431-438. doi: 10.1007/s42770-020-00403-0 PMID: 33185852

23. Algammal A. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from sheep and goats suffering from caseous lymphadenitis. ZVJ. 2016;44(1):1-8. doi: 10.21608/zvjz.2016.7826

24. Rizk D.Y, Hegazy Y.M, Orieby A.F, AL-Gaabary M.H. Some epidemiological and preventive measures for caseous lymphadenitis in sheep at qualin district. Kafrelsheikh Vet Med J. 2015;13(2):1-16. doi: 10.21608/kvmj.2015.10872827

25. Connor K.M, Fontaine M.C, Rudge K, Baird G.J, Donachie W. Molecular genotyping of multinational ovine and caprine *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates using pulsed-field gel electrophoresis. Vet Sci. 2007;38(4):613-623. doi: 10.1051/vetres:2007013 PMID: 17565908

26. Gallardo A.A, Toledo R.A, González Pasayo R.A, Azevedo V, Robles C, Paolicchi F.A, et al. *Corynebacterium pseudotuberculosis* biovar ovis: evaluación de la sensibilidad antibiótica in vitro. Rev Argent Microbiol. 2019;51(4):334-338. doi: 10.1016/j.ram.2018.12.001 PMID: 30797605

27. Li H, Yang H, Zhou Z, Li X, Yi W, Xu Y, et al. Isolation, antibiotic resistance, virulence traits and phylogenetic analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from goats in southwestern China. Small Rumin Res. 2018;168:69-75.

28. Robaj A.V.N.I, Hamidi A, Bytyqi H.Y.S.E.N, Sylejmani D. Frequency and antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from caseous lymphadenitis in sheep in Kosovo. Bulg J Agric Sci. 2017;23(6):1033-1036.

29. Pathirana H.N, Cho H.S, Cho Y.I, Kim C.L, Wimalasena S.H, Rajapaksha L.G, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from skin abscesses of native Korean goats (Capra hircus coreanae). J Appl Microbiol. 2022;133(3):2074-2082. doi: 10.1111/jam.15683 PMID: 35737750