Arshive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره اول، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۶: ۷۹-۷۱

شناسایی مولکولی وارزیابی توکسین زایی سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D جدا شده ازموارد آنتروتوکسمی در موسسه رازی

لیدا عبدالمحمدی خیاو [۱]، احمد رضا جباری*[۲]، رضا پیله چیان لنگرودی [۲]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی بخش تولید واکسن‌های باکتریایی بیهوازی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- دانشیاربخش تولید واکسن‌های باکتریایی بیهوازی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ: ۹۳/۱۰/۱۷ پذیرش: ۹۶/۸/۲۴

چکیده

باکتری کلستریدیوم پرفرینجنز عامل بیماری انتروتوکسمی در گوسفند می‌باشد. هدف از این مطالعه انتخاب بهترین سویه کلستریدیوم پرفرینجنزتیپ Dازایران و مقایسه آن با سویه واکسینال به وسیله تست‌های پتنسی و MLDاست. در این تحقیق، ۱۵ سویه تیپ Dمورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا آزمایشات میکروبیولوژی و بیوشیمیایی انجام شد، سپس نمونه‌هابه وسیله تست PCRتأیید شدند. در نهایت بهترین سویه‌ها به وسیله MLDانتخاب شد و واکسن انتروتوکسمی از نمونه سویه واکسینال و این سویه‌ها تهیه شد. واکسن برای مدت ۴۵ روز در یخچال نگه‌داری شد. سپس تست پتنسی طبق دستورالعمل‌های استاندارد بر روی نمونه‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که شرایط توکسین اپسیلون واکسن سویه‌های جدا شده در موسسه رازی با توکسین اپسیلون نمونه واکسن سویه واکسینال برابر می‌باشد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم پرفرینجنز، PCR، MLD، Potency، واکسن تتراوالان

*نویسنده مسئول: احمد رضا جباری

بخش تولید واکسن‌های باکتریایی بیهوازی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. تلفن: ۳۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶

پست الکترونیک: a. jabbari@rvsri. ac. ir

www.SID.ir

Arshive of SID

مقدمه

کلستریدیوم در خانواده باسیلاسه قرار می‌گیرد که یکی از جنس‌های مهم آن پرفرینجنز می‌باشد. این باکتری عامل بیماری انتروتوکسمی در گوسفند می‌باشد که یک بیماری حاد عفونی بوده و باعث همه گیری می‌شود. توکسین‌های اصلی این باکتری شامل α، β، ε و ι می‌باشد. مهم‌ترین توکسین تولید شده توسط همه تیپ‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*، توکسین α می‌باشد که یک لیسیتیناز است. این توکسین نفوذپذیری عروق را افزایش داده و منجر به همولیز و خونریزی گسترده، تخریب بافتی و میونکروز می‌شود. توکسین βعامل بروز ضایعات نکروزی در انتریت نکروز دهنده است. (انتریت نکروتیک) توکسین ε یک پروتوکسین می‌باشد که به وسیله تریپسین فعال می‌شود و نفوذپذیری عروق دیواره دستگاه گوارش را افزایش می‌دهد. توکسین ι دارای فعالیت نکروزی است و نفوذپذیری عروق را افزایش می‌دهد. این باکتری بر اساس توکسینهای اصلی به ۵ تیپ A تا E تقسیم می‌شود. اولین مورد عفونت کلستریدیایی در سال ۱۹۳۶ گزارش شد (۱۲). مطالعات بیشتر موید عفونت وسیع و گسترده در سراسر کشور برای سالها بود (۴). از سال ۱۹۵۰ تشخیص عامل عفونت کلستریدیایی توسط دکتر رفیعی و اردهالی گزارش شد (۱۷) و بیش از ۱۱۰ سویه توکسیژنیک در موسسه رازی جداسازی شد (۲) و (۵). برخی از بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بی هوازی کلستریدیایی که در موسسه رازی تشخیص داده شده‌اند شامل اسهال عفونی بره‌های نوزاد، استراک گوسفندهای بالغ، قلوه نرمی یا آنتروتوکسمی بز و گوسفندهای بالغ و براکسی گوسفندهای بالغ است. اولین واکسن تولید شده، واکسن شاربن علامتی گاو بود که در سال ۱۹۳۵ برای مبارزه با *کلستریدیوم شوئی* تهیه گردید. سپس واکسن چندتایی آنتروتوکسمی گوسفند و بز در سال ۱۹۴۴ تولید گردید (۳). در سال ۲۰۱۱ دکتر پیله چیان واکسن فیوژن از ژنهای توکسین اپسیلون و بتا در باکتری *E. coli* تولید نمود (۱۶) و (۱۵). در ایران گونه‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنز* از منابع مختلفی مانند خاک ونمونه‌های دامی جدا شده است (۵). در مطالعه حاضر سویه‌های فیلدی *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D جداسازی شده در موسسه رازی از لحاظ قابلیت توکسین زایی و سپس مقایسه پتنسی آن با سویه واکسینال بررسی و مطالعه گردید.

مواد وروش کار

سویه‌های باکتریایی: از ۱۵ سویه تیپ D و ۱ سویه واکسینال از *کلستریدیوم پرفرینجنز*تیپ D برای مقایسه توکسین زایی استفاده شد.

تست‌های تاییدی سویه‌های باکتریایی ایزوله شده: درمطالعه حاضر از تست فرمنتیشن برای قندهای گلوکز، مالتوز، مانیتول، ساکارز، سالیسین و لاکتوز و تست‌های ژلاتیناز، لیسیتیناز، مورفولوژی کلنی و مشاهده همولیز بر روی بلاد آگار در شرایط بیهوازی و تهیه اسلاید و تست کاتالاز از کلونی ایزوله شده در محیط تایو گلیکولات جامد استفاده شد. سپس تست PCR به منظور تأیید نهایی بر روی سویه‌ها انجام گرفت.

جهت انجام PCR ابتدا DNA را تخلیص می‌نماییم. برای این منظور نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ نموده سپس مایع رویی را اوت می‌کنیم. پلت را با سرم فیزیولوژی شستشو داده مجدداً در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌نماییم و دوباره پلت را با سرم فیزیولوژی شستشو می‌دهیم. سپس مجدداً سانتریفوژ و نهایتاً بر روی پلت PCR بافر 1X می‌ریزیم و به مدت ۲۰ دقیقه بویلینگ را انجام

www.SID.ir

Arshive of SID

مـی‌دهـیم. سـپس بـه مـدت ۵ دقیقـه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ کرده این بار مایع رویی را بـرای تسـت PCR استفاده مـی‌کنـیم. بـرای PCR، ۱۵ لانـدا PCR mix، ۱ لانـدا پرایمـر F، ۱ لانـدا پرایمـر R، ۴ لانـدا DNA template و ۹ لانـدا آب اضـافه مـی‌کنـیم. پرایمرهـای PCR در جـدول ۱ آورده شـده اسـت (۶) و (۱۹). در کنترل منفی بجای DNA template آب می‌ریزیم تا بـه حجـم ۳۰ لانـدا برسـد. سـپس نمونـه را در دسـتگاه ترموسایکلر گذاشته تـا PCR انجـام شـود. برنامـه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گـراد بـرای ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۱ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه، ۱ دقیقـه در ۵۵ درجـه سـانتی گـراد و ۱ دقیقـه در ۷۲ درجـه سـانتی گراد و متعاقب آن بسط نهایی برای ۱۰ دقیقه مـی‌باشـد. بعد در ژل آگاروز ٪۱ الکتروفورز مـی‌نمـاییم. سـپس از ژل عکـس مـی‌گیـریم. پـس از تأییـد بـه وسـیله PCR مناسـب‌تـرین محـیط کشـت را جهـت توکسـین زایـی انتخاب می‌کنیم.

انتخاب مناسبترین محیط کشت جهـت توکسـین زایـی: در این مطالعه ۴ محیط کشت به صورت زیـر تهیـه شـد محیط TYG (حاوی Tryptic soy broth 3%، گلـوکز ۲٪، عصـاره مخمـر ۱٪ و سیسـتیین ۱٪)، محـیط TPYG (حاوی پپتون گوشت ۵٪، پپتـون پرتئـوز ۰/۵٪، عصـاره مخمر ۵٪/۰، گلوکز ۰/۵٪، سدیم تایو گلیکولات ۰/۱٪ و سیستیین ۰/۰۵٪)، محیط کشت مدیفای شده در بخش بیهـوازی (حـاوی پپتـون ۳٪، نمـک ۰/۲۵٪، دی سـدیم فسـفات ۱٪، گلـوکز ۱٪ و تـریس ویتـامین ۰/۷۵٪) و محـیط کشـت معمـول واکسـن انتروتوکسـمی (حـاوی پپتون گوشت ۳٪، پپتون پرتئوز ۲٪، عصـاره مخمـر ۱٪، گلوکز ۱٪، پودر جگر ۰/۷۵٪، سیستیین ۰/۱٪، گوشـت قطعـه قطعـه شـده ۱۰٪، تـریس ویتـامین ۰/۷۵٪، نمـک ۰/۲۵٪ و دی سدیم فسفات ۱٪) تهیه شد. پس از تنظـیم PH در داخل لوله‌ها تقسـیم و در ۱۲۱ درجـه سـانتیگراد برای ۱۵ دقیقه اتوکلاو شـد. پـس از کشـت سـویه‌هـای واکسینال در ۴ محیط فوق الذکر به صورت آزمایشی و تست MLD به منظور مقایسه توکسین زایـی مناسـبترین محیط کشت، محیط بخش بی هوازی و مناسبترین زمان جهت تست، ۵ ساعت پس از کشت انتخاب شد.

کشت: آمپول لیوفیلیزه را داخل لوله ولکام جگـر تلقـیح نموده و بـه مـدت ۲۴ سـاعت در جـار بیهـوازی انکوبـه کرده، به عنوان کنترل لولـه نوترینـت آگـار و نوترینـت براث قرار داده و در انکوباتور در شـرایط هـوازی قـرار داده شـد. پـس از ۲۴ سـاعت سوسپانسـیون در محـیط بخـش بیهـوازی تلقـیح و در جـار بیهـوازی بـه مـدت ۵ ساعت انکوبه شـد. پـس از رشـد مجـدداً تسـت PCR و سپس تست MLD بر روی نمونه انجام شد.

تست MLD: دو میلی لیتر ازهـر نمونـه را در دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نموده سپس ازمـایع رویـی رقتهای مختلف را با سرم فیزیولوژی تولید نموده (بـرای تیپ D از رقـت ۱/۱۰ الـی ۱/۸۰۰۰) و هـر رقـت بـه دو موش N. M. R. I ۲۲-۱۷ گرمی به میزان ۰/۵ میلی لیتر به صورت داخل وریدی تزریق شد. آخـرین رقتـی کـه باعث مرگ موش شد به عنوان نتیجه تست گزارش شد. پس از انتخاب سویه آرشیو، ازسویه‌های انتخاب شـده و همچنین از سویه‌های واکسینال، دو واکسـن بـا نسـبتهای D٪۶۰، B٪۱۰، C٪۱۵، SP٪۱۵ تهیـه کـرده، پـس از فرمولاسیون تست استریلیتی، بی ضرری و عـدم سـمیت غیر عادی واکسن انجام شد.

تسـت اسـتریلیتی: نمونـه دو واکسـن در محـیط کشـت تایوگلیکولات مایع، TSB و بلاد آگار کشت داده شد. بلاد آگار به مدت ۷۲ سـاعت و تـایوگلیکولات مـایع و TSB به مدت ۱۴ روز انکوبه شد (۷).

www.SID.ir

Arshive of SID

تست بی ضرری: از دو واکسن به میزان ۵ و ۱۰ میلی لیتر به دو رأس گوسفند ۴۰ کیلوگرمی به ناحیه بالای کتف به صورت زیر جلدی تزریق نموده وگوسفندان به مدت ۱۴ روزتحت نظرقرار گرفتند (۷).

عدم سمیت غیر عادی واکسن: از دو واکسن به میزان ۰/۵ میلی لیتر به ۵ موش NIH به صورت زیر جلدی در ناحیه پا تزریق نموده و موشها به مدت ۷ روز تحت نظرقرار گرفتند (۷).

پس از مدت ۴۵ روز ازتولید واکسن تست پتنسی در مقایسه با سویه‌های واکسینال انجام شد.

تست پتنسی: نمونه دو واکسن به ۱۲ خرگوش به وزن ۳ کیلوگرم به میزان ۳ میلی لیتر به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت گردن تزریق شد. پس از ۲۸ روز تکرار تزریق و ۱۴ روز بعد خونگیری از قلب خرگوش انجام شد. سپس سرم جدا و بر روی آن تست پتنسی انجام شد.

مراحل تست پتنسی شامل:

۱- آماده سازی محلول توکسین: ۲ میلی لیترمحلول توکسین اپسیلون را با ۲۰ میلی گرم تریپسین مخلوط نموده تا توکسین اپسیلون فعال شود.

۲- آماده سازی آنتی توکسین استاندارد: آنتی توکسین استاندارد را با سرم فیزیولوژی مخلوط نموده بطوریکه برای اپسیلون محلول IU/ml ۱ بدست آید.

۳- آماده سازی آنتی سرم خرگوش واکسینال و آنتی سرم فیلدی: سرم خرگوشهای واکسینه شده را پس از خونگیری از قلب خرگوش جدا نمایید.

۴- آماده سازی محلولها برای تزریق: نسبت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹ ازآنتی توکسین استاندارد را با ۱ میلی لیتر ازتوکسین و ۰/۹، ۰/۷، ۰/۵، ۰/۳ و ۰/۱ سرم فیزیولوژی مخلوط نموده همین عمل برای آنتی سرم فیلدی و آنتی سرم واکسینال انجام شد. سپس محتویات لوله‌ها مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا نوترالیزاسیون بین توکسین و آنتی سرم انجام شود. سپس هررقت به دو موش N. M. R. I به وزن ۲۲-۱۷ گرم به میزان ۰/۵ میلی لیتر به صورت داخل وریدی به دم تزریق شد. در نهایت میزان آنتی توکسین بر حسب واحد بین الملل با بستن تناسب با مقایسه آنتی توکسین استاندارد و آنتی سرم واکسینال یا آنتی سرم فیلدی محاسبه شد (۸).

نتایج

سویه‌های جدا شده *کلستریدیوم پرفرینجنز* قادر به تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، لاکتوز و سوکروز بودند. ولی توانایی تخمیر قند سالیسین و مانیتول را نداشتند. همگی ژلاتیناز و لیسیتیناز مثبت و کاتالاز منفی (بیهوازی) بودند. تمامی سویه‌ها بر روی محیط کشت بلاد آگار کلنی خاکستری با همولیز بتا ایجاد کرده و دراسلاید باسیل گرم مثبت مشاهده شد. مناسب‌ترین محیط کشت، محیط کشت مدیفای شده در بخش بیهوازی و مناسبترین زمان جهت تست، ۵ ساعت پس از کشت انتخاب شد.

توکسین اپسیلون در ۴۰۰ کیلو باز، توکسین آلفا در ۹۰۰ کیلو باز و توکسین بتا در ۶۱۱ کیلو باز و در کنترل منفی باندی دیده نشد. نتیجه PCR در تصویر ۱ نشان داده شد.

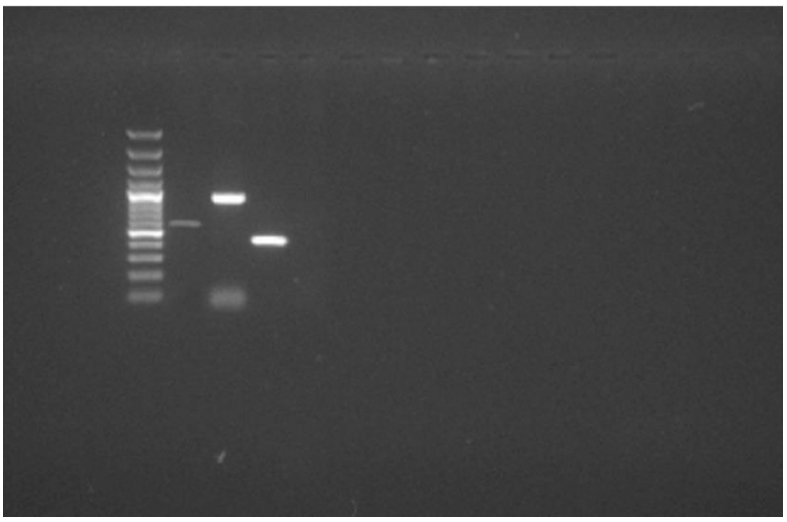
با توجه به نتایج MLD سویه‌های فیلدی D_{458} بالاترین میزان توکسین زایی را داشت (جدول شماره ۲).

تست استریلیتی دو واکسن نشان داد که آلودگی به سایر باکتریها و قارچها ندارند و همگی یک نوع باکتری خالص دارند. نتایج بی ضرری و عدم سمیت غیر عادی واکسن نشان داد که عارضه‌ای در گوسفندان و موشها ایجاد نشد و واکسن تهیه شده بی ضرر می‌باشد. نتایج نشان داد که در رقت ۰/۵ آنتی توکسین

واحد کرمانشاه
www.SID.ir

Arshive of SID

استاندارد اپسیلون یک موش و در رقت ۰/۱ آنتی سرم واکسینال دوموش مردند. (رقت ۰/۲) لذا مقدار آنتی سرم واکسینال و آنتی سرم فیلدی ۵ واحد بین المللی در میلی لیتر محاسبه گردید.



تصویر ۱: اولین چاهک مربوط به ladder، دومین چاهک توکسین بتا ۶۱۱ جفت باز، سومین چاهک توکسین آلفا ۹۰۰ جفت باز، چهارمین چاهک توکسین اپسیلون ۴۰۲ جفت باز، پنجمین چاهک کنترل منفی

جدول شماره ۱: پرایمرهای اولیگونوکلئوتید استفاده شده، سکانس پرایمر و طول محصول PCR

References	Amplicone	Sequence (5'-3)	Primers	Toxin Gene
Bauma et al (۲۰۰۴)	۹۰۰	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCCTGGGTTGTCCATTTC	CPA5L CPA5R	Cpa
Bauma et al (۲۰۰۴)	۶۱۱	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	CPBL CPBR	Cpb
Songer and Meer ۱۹۹۶	۴۰۲	5-TAC TCA TAC TGT GGGAAC TTC GAT ACA AGC-3 CTCATCTCCCATAACTGCACTATAATT٥ TCC-3	ETXII-F ETXII-R	Etx

جدول شماره ۲: MLD سویه‌های فیلدی و واکسینال کلستریدیوم پرفرینجنزتیپ D

رقت سویه	۱/۱۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۴۰۰۰	۱/۶۰۰۰	۱/۸۰۰۰	نتیجه	میـــــزان توکسین	سویه
۴۶۸	++	++	++					۱/۱۵۰۰	1170ng	نیوزلند
۴۶۰	++	++	++					۱/۱۵۰۰	1170ng	انستیتوپاستور
۴۵۸	++	++	++	++	+			۱/۴۰۰۰	3120ng	آفریقـــــای جنوبی
۴۳۱	++	++						۱/۵۰۰	390ng	خرم آباد
۴۳۲	++	++	++					۱/۱۵۰۰	1170ng	ساوه
۴۳۳	++	++	++					۱/۱۵۰۰	1170ng	سیرجان
۴۶۹	++	++						۱/۵۰۰	390ng	کرمان
۴۷۱	++	++						۱/۵۰۰	390ng	هشتگرد
۴۴۴	++	++						۱/۵۰۰	390ng	هشتگرد
۴۴۷	++	++	+					۱/۱۰۰۰	780ng	خرم آباد
۴۱۳/۲	++	++						۱/۵۰۰	390ng	تبریز
۴۵۳	++	++	++					۱/۱۵۰۰	1170ng	خرم آباد
۴۵۶	++	++						۱/۵۰۰	390ng	خرم آباد
۴۴۰	++	++						۱/۵۰۰	390ng	هشتگرد
۴۵۰	++	++						۱/۵۰۰	390ng	کرمانشاه
واکسینال	++	++	++	++	+			۱/۴۰۰۰	۳۱۲۰ng	واکسینال

واحد کرمانشاه

www.SID.ir

Arshive of SID

بحث و نتیجه گیری

کلستریدیومها به دلیل ایجاد اسپور از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند. زیرا اسپور آن‌ها می‌تواند از طریق خوراک دام ویا تماس با زخم باز باعث بیماریزایی گردد. *کلستریدیوم پرفرینجنز* که عامل بیماری انتروتوکسمی می‌باشد یک باسیل گرم مثبت بی هوازی بوده که باعث همه گیری می‌شود. توکسینهای اپسیلون و بتا از فاکتورهای ویرولانس هستند. به منظور مقابله با عفونت ناشی ازاین باکتری واکسیناسیون به موقع ضروری است که برای تولید آن باکتری‌ها در محیطهای کشت مخصوص تکثیر و توکسینهای خود را به محیط کشت ترشح می‌کنند و سپس توکسین به توکسوئید تبدیل وپس از فرمولاسیون واکسن بدست می‌آید (۱۳). واکسن‌های رایج به صورت مخلوطی ازتعدادی باکترین یا توکسوئید یا مخلوط چند باکترین و توکسوئید است (۸). در ایران واکسن چهار ظرفیتی آنتروتوکسمی توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تولید می‌شود. وجود کلستریدیومها در نقاط مختلف جهان متفاوت می‌باشد. به عنوان نمونه *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B در قاره آمریکای شمالی یافت نشده است (۲۰). در حالیکه در انگلستان و آفریقای جنوبی عامل اسهال خونی در بره می‌باشد که ضرر و زیان سنگینی را به بار می‌آورد (۲۰) و (۱۱). در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ در منطق ساحل شمالی ایران صورت گرفته سویه‌های تیپ A، B، E *کلستریدیوم بوتولینوم* گزارش شده است (۲۱). تحقیقات انجام شده در روی سویه‌های جدا شده باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنز*در ایران ثابت کرده است که تیپ B این باکتری عامل اسهال عفونی بره‌های نوزاد و عامل انتریت هموراژیک در گوسفندهای بالغ و بزغاله است که تحت عنوان تیپ B ازایران گزارش شده است و Dwight در کتاب میکروبیولوژی به آن اشاره کرده است (۹). تفاوت دو تیپ در ترشح بعضی از توکسین‌های فرعی نیز می‌باشد. اکنون در جداول بیماریهای ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنز*در انسان و دام که در کتب علمی به چاپ رسیده نام *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B عامل انتریت هموراژیک گوسفند ذکر گردیده که با تیپ B کلاسیک تفاوت دارد. با توجه به ترکیبات آنتی ژنیک در ایران این باکتری به عنوان عامل انتروتوکسمی در گوسفند و بز مطرح می‌باشد. بنابراین این باکتری یکی از اجزاء واکسن پلی والان انتروتوکسمی در ایران می‌باشد که در بعضی کشورها مطرح نمی‌باشد. در مطالعه حاضر از تستهای بیوشیمیایی و میکروبیولوژی و PCR برای شناسایی کلستریدیومها استفاده شد. انواع روش‌های استخراج DNA وجود دارد. در مطالعه احسنی، PCR مستقیم از کلونی (بدون استخراج) پیشنهاد شد زیرا زمان، مراحل و هزینه PCR را کاهش می‌دهد و امکان آزمایش بسیاری از نمونه‌ها را در زمان کوتاه فراهم می‌کند. (۱) توکسین اپسیلون در ۴۰۰ کیلو باز، توکسین آلفا در ۹۰۰ کیلو باز و توکسین بتا در ۶۱۱ کیلو باز و در کنترل منفی باندی دیده نشد. همین نتایج در مطالعه Songer و Meer و جباری نیز مشخص شد (۱۹)و (۱۰). در مطالعه Rood برای تشخیص کلستریدیوم‌ها از توکسین‌های اصلی برای تعیین تیپ سویه‌ها و توکسین‌های فرعی برای تعیین زیر تیپ‌ها استفاده شد (۱۸). Sterne تحقیقی در زمینه MLD *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D انجام داد که نتیجه آن از رقت ۱/۱۵ تا ۱/۳۰۰ بود (۱۴). در این بررسی محدوده MLD *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D از رقت ۱/۵۰۰ تا ۱/۴۰۰۰ بود که نسبت به تحقیق مذکور نتیجه مناسبتری را نشان داد (۱۴) و شرایط لازم برای تولید توکسین سویه فیلدی انتخاب

www.SID.ir

Arshive of SID

شده برابر با سویه واکسینال بود که با استاندارد بین المللی EP نیزمطابقت دارد. البته لازم است تا آزمایشات تکمیلی دیگری انجام شود تا در صورت اطمینان از حصول سایر شرایط بتوان بعنوان کاندید در فرایند تولید یک واکسن ازمایشی مورد استفاده قرار گیرد.

پیشنهادات

۱- مطالعات تکمیلی در جهت جدا سازی سویه‌های جدید فیلدی و غربالگری توکسین زایی در بین آنها به منظور یافتن سویه‌های قویتر از نظر تولید توکسین انجام شود.

۲- مطالعات تکمیلی در زمینه اثرات محیطها و غنی کننده‌ها مانند تریس ویتامین و تریس المنت بر توکسین زایی سویه‌های انتخاب شده انجام شود.

۳- تحقیقات در زمینه ایجاد سویه‌های نوترکیب (Recombinant) که دارای توان مطلوب در بیان توکسینهای اپسیلون و بتا باشند، انجام گیرد.

تقدیر و تشکر:

بخشی از هزینه‌های این پژوهش در قالب طرح شماره ۸۶۰۲۲-۱۸-۱۸-۲ و توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین گردیده است. از همکاران بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بی هوازی موسسه رازی بواسطه مساعدت در انجام این مطالعه تشکر می‌شود.

منابع

1-Ahsani, M. R. , Shamsaddini, B. M. (2013). Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in *Clostridium perfringens* typing. *Scientific-Research Iranian Veterinary Journal* **8**: 5-12.

2-Ardehali, M. (1969). Some observations on *Clostridium perfringens* strains isolated in Iran.. *Archives of Razi Institute***21**: 60 – 66.

3-Ardehali, M., Darakhshan, H. (1976). Production and standardization of *Clostridium perfringens* polyvalent vaccine in Iran. *Developmental Biology*32: 31-34.

4-ARDEHALI, M., DARAKHSHAN, H., MOOSAWI, M. (1984). THE EXISTENCE AND PRESENT SITUATION OF CLOSTRIDIAL DISEASES OF DOMESTIC ANIMALS IN IRAN. *ARCHIVES OF RAZI INSTITUTE***34**: 27.

5- Ardehali, M., Moosawi, M., Pilehchian, R. (1994). Isolation of toxigenic strains of *Clostridium perfringens* from the soil of farms in Iran. *Archives of Razi Institute***44**,**45**: 95-100.

6-Baums, C. G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology***100**: 11-16.

7-*European Pharmacopoeia*. *Clostridium perfringens* for veterinary use. 2005. 5th edition. 1:744-747.

8-European Pharmacopoeia. *Clostridium perfringens Vaccines* for Veterinary use. 2008: 363.

9-Ghazi, F., Younan, M., Ardehali, M., Muller,W. (1997). Differentiation of proteinase (minor toxin lambda) in *Clostridium perfringens* strains from sheep and goats in Iran. *Deutsche TierarztlicheWochenschrift***104**: 443-445.

10-Jabbari, A. R., Afshari Far, S., Esmaelizad, M., PilehchianLangroudi, R., MoosawiShooshtari, M., AbdolmohammadiKhiav, L. (2011). Molecular typing of toxigenic *Clostridium perfringens* isolated from sheep in Iran. *Archives of Razi Institute* **66**: 81-86.

11- JANSEN, B. C**.,** CLARK, R., LOUW, J. G., DE KOCK, V. E., ALEXANDER, R. A. (1961). THE BETA TOXIN OF *CLOSTRIDIUM WELCHII* TYPE B, WILSDON, IN RELATION TO THE PRODUCTION OF A VACCINE AGAINST LAMB DYSENTERY. ONDERSTEPOORT. *JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH***28**: 495-549.

12-Kaveh, M. (1957). *Journal of Veterinary Medicine* **3**: 1-8.

13-Nijland, R., Lindner, C., Hartskamp, M., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P. (2007). Heterologous production and secretion

www.SID.ir

Arshive of SID

of *Clostridium perfringens* beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. *Journal of Biotechnology***127**: 361-372.

14-Nillo, L. (1980). *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. *The Canadian Veterinary Journal***21**: 141-148.

15- PilehchianLangroudi, R., Aghaei Pour, K., Shamsara, M., Ghorashi, S. A. (2012). In silico fusion of epsilon and beta toxin genes of *Clostridium perfringens* types D and B. *Iranian Journal of Biotechnology***10**: 54-60.

16-Pilehchian Langroudi, R., Aghaei Pour, K., Shamsara, M., Jabbari, A. R., Habibi, G. R., Goudarzi, H., et al. (2011). Fusion of *Clostridium perfringens* type D and B epsilon and beta toxin genes and it's cloning in *E. coli*. *Archives of RaziInstitute***66**: 1-10.

17-Rafyi, A., Ardehali. M. (1961). Diseases of animals caused by *Clostridium welchii*. *Bulletin - Office International Des Epizooties* **55**: 5-6.

18-Rood, JI., Cole, ST. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological reviews* **55**: 621-648.

19-Songer, J. G., Meer, R. R. (1996). Genotyping of *Clostridium perfringens*by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of*Clostridial* enteric disease in animals. *Anaerobe***2**: 197-203

20-Sterne, M., Batty, I. (1975). Pathogenic Clostridia. Butterworth & Co. London.

21-TAVAKOLI, HR., RAZAVILAR,V. (2003). ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM BOTIULINUM* (TYPES A, B, E) IN SEDIMENTS FROM COASTAL AREAS IN THE NORTH OF IRAN**.** *IRANIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH* **32**: 37-40.

www.SID.ir

Arshive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue1, 2018

Molecular identification and evaluation toxin production of *Clostridium perfringens* type D strains isolated cases of the enterotoxaemia in the Razi Institute

***AbdolmohammadiKhiav, L.*[1], *Jabbari, A.R.*[*2], *PilehchianLangroodi, R.*[2]**

1. Master of Microbiology Department of Anaerobic Bacterial Vaccines Production, Razi Vaccine and Serum Institute, Agricultural Research and Education Research Organization, Karaj, Iran
2. Associate ProfessorDepartment of Anaerobic Bacterial Vaccines Production, Razi Vaccine and Serum Institute, Agricultural Research and Education Research Organization, Karaj, Iran

Received Date: 7January 2015 *Accepted Date: 15 November 2017*

Abstract:*Clostridium perfringens is cause of enterotoxaemia disease in sheep. The purpose of this research was to select the best strain Clostridium perfringens type D isolated from Iran and their comparison with vaccinal strain by MLD and potency tests. In this research 15 strains Clostridium perfringens type D were studied. At first, microbiological and biochemical tests were done then specimens were confirmed by PCR test. Finally, the best strain was selected by MLD test and the enterotoxaemia vaccine was prepared by the selected and the vaccine strain separately. The vaccines were kept for 45 days at refrigerator then potency test was done according to standard protocols. The results showed that the conditions for epsilon toxin production by isolated strain and the vaccine strain was nearly similar.*

Keywords: Clostridium perfringens, PCR, MLD, potency, Tetravalent vaccine

**Corresponding author: Jabbari, A.R.*
Address Department of Anaerobic Bacterial Vaccines Production, Razi Vaccine and Serum Institute, Agricultural Research and Education Research Organization, Karaj, Iran. Tel: +982634570038
Email: a.jabbari@rvsri.ac.ir

www.SID.ir