مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره اول (پیاپی ۱۸) بهار ۱۳۹۳
صفحات ۴۸-۳۸

Original Article

بررسی سمیت توکسین های آلفا (α) و اپسیلون (ε) *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D

مهناز کریمی[۱]، مهرداد شمس الدینی بافتی[*۲]، مجید عزتخواه[۳]، محمد کارگر[۴]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه کرمان، گروه تحقیق و تولید فرآورده های بیولوژیک، [۳] مربی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه کرمان، [۴] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *کلستریدیوم پرفرنجنس* یکی از مهمترین گونه های بیماری زا در جنس *کلستریدیوم* است. توکسین های آلفا (α) و اپسیلون (ε) از توکسین های اصلی این باکتری به شمار می آید. این مطالعه با هدف بررسی بیان ژن های کد کننده و سمیت توکسین های *کلستریدیوم پرفرنجنس* تایپ D در دو محیط کشت پایه و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر انجام شد.

مواد و روش ها: در ابتدا سویه استاندارد بر روی محیط کشت های پایه که نیمی از آنها حاوی پودر جگر بود کشت داده شد. سپس RNA استخراج و پس از تبدیل شدن به cDNA، با واکنش زنجیره ای پلی مراز دوگانه، توکسین ها از نظر بیان ژن مورد بررسی قرار گرفتند. میزان سمیت با استفاده از آزمون میزان حداقل کشندگی (MLD) و میزان پروتئین با دستگاه اسپکتروفتومتری بررسی شدند.

یافته ها: الکتروفورز محصولات PCR با ایجاد باندهای ۳۲۴ و ۶۲۵ جفت بازی به ترتیب بیان موفقیت آمیز ژن های کد کننده توکسین های آلفا و اپسیلون را در دو محیط کشت نشان داد. در این مطالعه میانگین حداقل میزان کشندگی توکسین در گروه های محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر به ترتیب معادل ۱/۴۰۰۰ و ۱/۴۳۳۳ بود. میانگین میزان پروتئین در محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر به ترتیب معادل ۹۴/۳۹ و ۴۸/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه گردید.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که ژن های کد کننده در حضور پودر جگر بیان می شوند. همچنین با ارزیابی آزمون MLD در دو محیط کشت مشخص شد که اگرچه توکسین توانایی کشندگی خود را حفظ کرده است اما افزودن پودر جگر تاثیر بسزایی بر میزان کشندگی توکسین ندارد.

واژگان کلیدی: *کلستریدیوم پرفرنجنس*، محیط کشت، بیان ژن، توکسین، پودر جگر.

دریافت مقاله: مهرماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۲

مقدمه

جنس *کلستریدیوم* (*Clostridium*)، بیش از ۸۰ گونه دارد. به طوری که گروه متنوعی از باکتری های گرم مثبت میله ای با توانایی تشکیل اسپور را تشکیل می دهد. این ارگانیسم، اصولاً بی هوازی اجباری است. اما برخی از گونه ها، توانایی بقا در حضور مقدار کمی اکسیژن را دارند. *کلستریدیوم پرفرنجنس* (*Clostridium perfringens*)، یکی از بیشترین گونه های بیماری زا در جنس های *کلستریدیوم* می باشد. این باکتری میله ای، گرم مثبت، اسپورزا، بی حرکت و بی هوازی است و باعث ایجاد بیماری در انسان و دام می شود. همچنین این باکتری به

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، کیلومتر ۱۷ جاده کرمان – جوپار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه کرمان، بخش تحقیق و تولید فرآورده های بیولوژیک
تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۰۶۳۸ پست الکترونیک: m.shamsaddini@rvsri.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

طور فراوان در خاک، آب، غذا، مدفوع و روده انسان و حیوانات وجود دارد (۱ و ۲). *کلستریدیوم پرفرنجنس* پس از مرگ انسان و حیوانات، جزء اولین گروه باکتری هایی است که به بافت های مختلف جسد هجوم می برد و موجب گندیده شدن آن می گردد. در جنگ جهانی اول این باکتری به عنوان یک عامل مهم قانقاریای گازی شناخته شد و موجب مرگ صدها هزار سرباز گردید (۱). این باکتری قادر است به اشکال مختلف بیماری زایی درآید و باعث بیماری های هیستوتوکسیک و روده ای زیادی در انسان و حیوانات شود (۳ و ۴).

کلستریدیوم پرفرنجنس قادر به تولید حداقل ۱۷ توکسین است که تمام آنها پروتئیی و دارای خاصیت پادگنی می باشند. سویه های منحصر به فردی، زیر مجموعه هایی از توکسین ها را تولید می کنند. به طوری که چهار توکسین اصلی آلفا (α)، بتا (β)، اپسیلون (ε) و یوتا (ι) برای استفاده در طبقه بندی *کلستریدیوم پرفرنجنس* به تیپ های A، B، C، D و E کاربرد دارد (۷-۵). از این میان توکسین اپسیلون، به عنوان یکی از مهم ترین توکسین های این باکتری شناخته می شود (۲، ۱۰-۸). توکسین اپسیلون، توسط تیپ های B و D *کلستریدیوم پرفرنجنس* به شکل نسبتاً غیر فعال (که پروتوتوکسین اپسیلون نامیده می شود)، تولید و در مجرای روده ای، توسط تریپسین، فعال می گردد. این توکسین، به عنوان دستهٔ B عامل بیوتروریسم، پس از توکسین های تتانوس و بوتیلینوم تقسیم بندی می شود (۴ و ۱۱).

به منظور تشخیص توکسین باکتری، از آزمون خنثی سازی سرم (Sero-neutralization) در موش و خوکچه هندی استفاده می شود. نتیجه این آزمایش ۷۲ ساعت پس از انجام آزمایش قرائت می شود که فرآیندی وقت گیر، پر هزینه و تک ظرفیتی می باشد (۵ و ۶). علاوه بر آزمایش خنثی سازی سرم، روش های سرولوژیکی و مولکولی دیگری نیز برای تعیین نوع توکسین وجود دارد. از مهم ترین آنها می توان به آزمایش آگلوتیناسیون لاتکس (Latex agglutination test)، کانتر ایمونوالکتروفورز (Counter immunoelectrophoresis) و الایزا (ELISA) اشاره نمود که هر کدام معایب و مزایای مخصوص به خود را دارند (۱ و ۲). یکی از روش های جدیدی که می توان حضور یا عدم حضور یک ژن خاص را در مخلوطی از DNA یا RNA بررسی کرد و نیازی به خالص بودن DNA یا RNA ندارد، واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) می باشد. این روش از ویژگی های زیادی مانند سرعت، دقت و حساسیت بسیار بالا برخوردار بوده و بسیار سریع تر و دقیق تر از روش های قدیمی عمل می نماید (۱۲).

جدایه های تیپ D تولید کنندهٔ اپسیلون، عامل ایجاد کننده آنتروتوکسمی بسیار کشنده، خصوصاً در گوسفند و بز می باشند (۲). آنتروتوکسمی ایجاد شده توسط پروتوتوکسین های اپسیلون *کلستریدیوم پرفرنجنس*، می تواند سبب مرگ و میر در حیوانات اهلی شود (۲، ۱۰ و ۱۱). یکی از راه های کنترل بیماری های ناشی از این گروه باکتری ها، تهیه واکسن می باشد. با توجه به فرآیند تولید واکسن، لازم است در مرحله ای سوش های واکسینال در محیط کشت های مغذی تکثیر پیدا کنند. بنابراین اگر مشخص شود که در یک محیط کشت مغذی، سمیت افزایش پیدا می کند می توان از آن برای ارتقاء کیفیت ایمنی زایی واکسن استفاده نمود. از آنجائی که یکی از خصوصیات *کلستریدیوم پرفرنجنس* ترشح توکسین به درون محیط کشت می باشد، به منظور مقایسه سمیت می توان از آزمون تعیین حداقل میزان کشندگی (Minimum Lethal Dose) بر اساس دستور العمل دارویی کشور اروپا استفاده نمود (۱۳).

این مطالعه با هدف بررسی بیان ژن های کد کننده توکسین های آلفا و اپسیلون *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D در دو محیط کشت پایه و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر و نیز سنجش میزان سمیت آنها انجام شد.

مواد و روش ها

الف) پاساژ سوش: در ابتدا محیط کشت های مغذی بر اساس دستورالعمل استاندارد موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه کرمان تهیه و پس از انجام مراحل استریلیزاسیون و اطمینان از عدم وجود آلودگی، سوش واکسینال *کلستریدیوم*

Archive of SID
www.SID.ir

پرفرنجنس تیپ D (Cl. D409) به محیط کشت ها اضافه گردید. در ادامه محیط ها با ایجاد شرایط بی هوازی با دستگاه آنوکسومات (MART® Microbiology B.V. the Netherlands)، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. پس از اطمینان از رشد و پاساژ سوش، محیط کشت پایه بر اساس دستورالعمل بخش به تعداد ۱۲ عدد ساخته شد. به طوری که به نیمی بر اساس دستورالعمل رایج بخش (گروه D_1) و به نیمی دیگر پودر جگر (Himedia, India) به میزان ۷ گرم در لیتر (گروه D_2) اضافه گردید. پس از اطمینان از عدم وجود آلودگی، سوش واکسینال *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D پاساژ داده شده، تلقیح گردید. پس از گرما گذاری، از هر یک از ظروف کشت داده شده حاوی محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر، به میزان ۲۰ میلی لیتر نمونه گیری به عمل آمد تا در مرحله انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گیرد.

ب) استخراج RNA برای این منظور از کیت (RNX-PLUS سیناژن، ایران) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. به طور خلاصه در ابتدا نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، یک میلی لیتر محلول سرد شدهٔ RNXTM-PLUS و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر نمونه اضافه گردید. سپس نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. بعد از انجام سانتریفیوژ فاز رویی به میکروتیوب عاری از RNase انتقال یافت و ایزوپروپانول با حجم مساوی به آن اضافه گردید. سپس با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و پس از اضافه نمودن اتانول ۷۵ درصد، رسوبات با ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربونات (Diethylpyrocarbonate) حل گردید.

ج) واکنش زنجیره ای پلی مراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR): به منظور سنتز cDNA ابتدا مخلوط RNA-primer با حجم کل ۱۰ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر RNA تام، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (جدول ۱)، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP و ۲/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، آماده گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی گراد قرار گرفت. در مرحلهٔ بعد مخلوط سنتز cDNA با حجم کل ۱۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر M-MuLV (۱۰)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم ترانسکریپتاز M-MuLV و ۷/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز تهیه شد (۱۶- ۱۴). مخلوط سنتز cDNA به مخلوط RNA-primer اضافه گردید. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجهٔ سانتی گراد قرار گرفت.

واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۱/۵ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ میکرومولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۲/۵ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت ۲/۵ میکرومولار)، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (غلظت ۵ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر) انجام گردید (۱۵ و ۱۶).

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (بیوراد، آمریکا) با شرایط دمایی ۱۰ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، گسترش در دمای

جدول ۱: توالی آغازگرها جهت واکنش زنجیره ای پلی مراز

توکسین	ژن	توالی (۳'- ۵')	اندازه (bp)
آلفا	*plc*	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	۳۲۴
اپسیلون	*etx*	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	۶۵۵

Archive of SID
www.SID.ir

۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی DNA safe stain منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله ژل داک مورد بررسی قرار گرفت.

د) حداقل میزان کشندگی: به این منظور از محیط کشت های پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر کشت داده شده *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D، قبل از اضافه کردن فرمالدئید استفاده شد. پس از سانتریفیوژ، رقت های متفاوتی از توکسین تهیه و از هر رقت به میزان ۰/۵ میلی لیتر به دو موش تزریق گردید. موش ها به مدت ۷۲ ساعت تحت نظر گرفته شدند و موارد مرگ با رقت مربوطه گزارش شد. بر اساس تلفات مشاهده شده، حداقل میزان کشندگی تعیین گردید.

ه) سنجش میزان پروتئین: میزان پروتئین تام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری تخمین زده شد. به این منظور، رقت های ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ از هر کدام از محیط کشت های پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر کشت داده شده *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D، قبل از اضافه کردن فرمالدئید تهیه گردید. سپس میزان جذب نور (OD) در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت و بر اساس فرمول زیر مقدار پروتئین تعیین شد (۱۷).

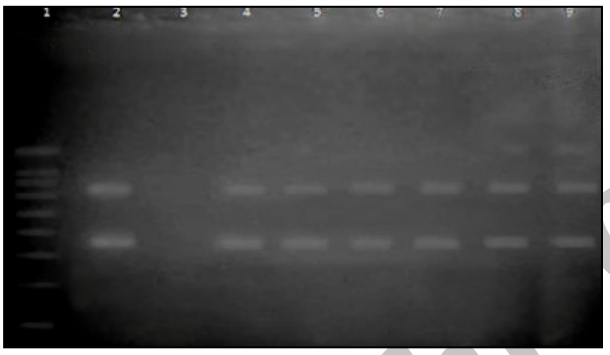
غلظت پروتئین(mg/ml) = (1.55×OD280nm)-(0.76×OD260nm)

یافته ها

الف) نتایج واکنش زنجیره ای پلی مراز با نسخه برداری معکوس: نتایج نشان داد که اندازه باندهای مربوط به ژن های کد کننده توکسین های آلفا و اپسیلون به ترتیب معادل ۳۲۴ و ۶۵۵ جفت باز (bp) می باشد. این امر نشان دهندهٔ بیان موفقیت آمیز ژن های کد کننده توکسین های آلفا و اپسیلون در دو محیط کشت می باشد (شکل ۱).

ب) نتایج حاصل از بررسی حداقل میزان کشندگی توکسین: پس از تزریق نمونه های رقیق شده، موش های تحت آزمایش به مدت ۷۲ ساعت تحت نظر گرفته شد. سپس بر اساس تعداد موش های تلف شده در هر گروه، حداقل میزان کشندگی تعیین گردید (جدول ۲). در این مطالعه میانگین حداقل میزان کشندگی توکسین در گروه های محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر به ترتیب معادل ۱/۴۰۰۰ و ۱/۴۳۳۳ بود. این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود.

ج) نتایج حاصل از بررسی میزان سنجش پروتئین: در این پژوهش میانگین میزان پروتئین در محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر به ترتیب معادل ۹۴/۳۹ و ۴۸/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. این اختلاف از نظر آماری معنی داری بود.



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز. ستون ۱) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲) کنترل مثبت، ستون ۳) کنترل منفی، ستون های ۴ تا ۶) نمونه های حاصل از کشت در محیط کشت پایه، ستون های ۷ تا ۹) نمونه های حاصل از کشت در محیط کشت پایه حاوی پودر جگر).

بحث

در مطالعه حاضر با استفاده از روش های RT-PCR و duplex PCR مشخص گردید که ژن های کدکننده توکسین های آلفا و اپسیلون در محیط کشت به طور موفقیت آمیز بیان شده اند. همچنین با استفاده از آزمایش MLD مشخص شد که افزودن پودر جگر به محیط کشت پایه رایج تاثیری بر افزایش میزان توکسین در تیپ D *کلستریدیوم پرفرنجنس* ندارد.

بیماری های باکتریایی و افزایش آن یک مشکل جهانی است. به طوری که هر ساله تعداد زیادی دام، طیور و حتی انسان در اثر

Archive of SID
www.SID.ir

آلودگی به باکتری های جنس *کلستریدیوم* تلف می شوند و خسارات جانی و مالی فراوانی به بار می آید. بیماری های زیادی توسط *کلستریدیوم پرفرنجنس* ایجاد می شود برای مثال قانقاریا که در اثر تولید توکسین آلفا و آنتروتوکسمی در اثر تولید توکسین اپسیلون ایجاد می شود. یکی از راه های کنترل بیماری های ناشی از این باکتری ها، تهیه واکسن مناسب می باشد. بر همین اساس شناسایی ژن های کد کننده مربوط به این توکسین ها حائز اهمیت می باشد.

بسیاری از محققین با اضافه کردن ترکیبات و مواد مورد نیاز به محیط کشت ها، رشد و تکثیر ارگانیسم ها را مورد بررسی قرار دادند. پودر جگر یک ترکیب سنتتیک تجاری بوده و در مواردی به عنوان ترکیب غنی کننده محیط کشت رشد باکتری کاربرد دارد. در حال حاضر از این ترکیب در فرآیند تولید واکسن، به عنوان محرک رشد و تکثیر *کلستریدیوم پرفرنجنس* در سیستم فرمانتوری در کشور استفاده می شود. از آنجائی که در سیستم غیر فرمانتوری، از پودر جگر استفاده نمی شود لذا با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که اضافه کردن پودر جگر مانع از بیان ژن های آلفا و اپسیلون *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D نمی شود.

مازوچی (Mazoochi) و همکاران در سال ۲۰۱۰ تاثیر اضافه کردن اسیدآسکوربیک بر بیان ژن های *bax* و *bcl-2* را مورد بررسی قرار دادند. آنها نتیجه گرفتند که اسید آسکوربیک سبب کاهش بیان ژن *bax* در گروه غیر انجمادی و بهبود رشد فولیکول ها پس از انجماد شیشه ای تخمدان می گردد (۱۸).

PCR تکنیکی است که که می توان حضور یا عدم حضور یک ژن خاص را در مخلوطی از DNA یا RNA بررسی نمود. یک روش تغییر یافته از PCR، واکنش زنجیره ای پلی مراز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) می باشد که یک روش انتخابی، سریع و نیازمند میزان کم RNA در نمونه می باشد (۱۹). در مطالعه حاضر نیز از این روش استفاده شد. با مشاهده باندهای ایجاد شده در الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز مشخص شد که توکسین های آلفا و اپسیلون در درون هر دو محیط کشت بیان شده اند. به عبارت دیگر توکسین های آلفا و اپسیلون در ابتدا به صورت RNA از روی ژنوم باکتری *کلستریدیوم پرفرنجنس* ترجمه شده و سپس در روند نسخه برداری معکوس به cDNA تبدیل و با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز و الکتروفورز به صورت باند بر روی ژل دیده شدند.

نایتس (Nuyts) و همکاران در سال ۲۰۰۱ سه روش متفاوت را برای استخراج RNA از باکتری های گرم مثبت مقایسه کردند. این سه روش عبارت بودند از: ۱) روش اسید- فنل، ۲) استفاده از کیت RNeasy mini (شرکت کیاژن، آمریکا) ۳) سیستم جداسازی RNA تام از پرومگا. نتایج آنها نشان داد که جداسازی RNA با استفاده از کیت RNeasy mini اگرچه گرانقیمت است اما یک روش آسان و سریع برای جداسازی RNA با کیفیت عالی در مقدار زیاد *کلستریدیوم* ها می باشد (۲۰). عثمان (Osman) و همکاران در سال ۲۰۰۹ از روش الکتروفورز SDS-PAGE برای تشخیص دو توکسین آلفا و اپسیلون *کلستریدیوم پرفرنجنس* در محیط کشت ناخالص مثل شیر استفاده کردند. نتایج نشان داد که SDS-PAGE می تواند برای تشخیص ژنوم توکسین های آلفا و اپسیلون در یک محیط کشت ناخالص به کار برده شود (۲۱).

باداگالیکا (Badagliacca) و همکاران در سال ۲۰۱۰ از واکنش زنجیره ای پلی مراز چندگانه (Multiplex PCR) به منظور شناسایی ژن های *cpa*، *cpb1*، *cpetx* و *cpi* و از واکنش زنجیره ای پلی مراز دوگانه برای شناسایی ژن های *cpb2*، *cpe* کد کننده آنتروتوکسین α، β1، ε، *ι* و β2 استفاده نمودند. نمونه ها به ترتیب شامل ۱۹ جدایه از خرگوش و ۴۱ جدایه از حیوانات مزرعه بود. ژن *cpa* به تنهایی یا در ارتباط با ژن *cpb2* در تمامی نمونه ها تشخیص داده شد. ژن *cpb2* در ۷ سویه *کلستریدیوم پرفرنجنس* از جدایه های خرگوش (۳۶/۸ درصد) و ۹ جدایه از حیوانات مزرعه (۲۱/۹ درصد) تشخیص داده شد. همچنین ژن *cpa* در ۶۳/۲ درصد از جدایه های خرگوش و ۷۶/۹ درصد از جدایه های حیوانات مزرعه یافت گردید (۲۲).

وانگ (Wang) و همکاران در سال ۲۰۱۰ از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز کمی دوگانه (duplex-qPCR) برای

Archive of SID
www.SID.ir

تشخیص ژن های کد کننده توکسین های *کلستریدیوم پرفرنجنس* (*cpa*، *cpb*، *cpb2*، *etx*، *ia* و *cpe*) در گاو استفاده نمودند. نمونه ها از ۲۶۱ گاو شیرده متعلق به سه گله در نینگسیا (Ningxia) چین جمع آوری شده بود. با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز کمی دوگانه در ۱۷۶ نمونه ای که در واکنش زنجیره ای پلی مراز مثبت تشخیص داده شد، وجود ژن های *cpa*، *etx*، *cpb2* و *cpe* به ترتیب در ۱۷۶ (۱۰۰ درصد)، ۱۵ (۸/۵ درصد)، ۱۴۲ (۸۰/۷ درصد) و ۴ (۲/۳ درصد) تایید شد. یافته های آنها نشان داد که سویه های تولید کنندهٔ توکسین β2 *کلستریدیوم پرفرنجنس* به طور وسیع در گاوهای شیرده در نینگسیا شیوع دارد و احتمالا نقش مهمی در ارتباط با بیماری اسهال ناشی از *کلستریدیوم پرفرنجنس* ایفا می نماید (۲۳).

محمد (Mohamed) و همکاران ۱۵۰ نمونه از شتر (۷۵ نمونه مدفوع و ۷۵ نمونه سوآپ از لاشه) از کشتارگاه زاگازیگ (Zagazig) و ۶۰ نمونه مدفوع انسانی (۴۰ نمونه مبتلا به اسهال و ۲۰ نمونه غیر اسهالی) را از بیمارستان عمومی زاگازیگ جمع آوری کردند و به منظور جداسازی *کلستریدیوم پرفرنجنس* این نمونه ها را مورد بررسی قرار دادند. واکنش زنجیره ای پلی مراز چندگانه برای تشخیص ژن های *cpa*، *cpb*، *cpb2*، *etx*، *iap* و *cpe* در جدایه ها انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تیپ های A، B، C، D و E *کلستریدیوم پرفرنجنس* به ترتیب به میزان ۲۶/۴۰ (۶۵ درصد)، ۴/۴۰ (۱۰ درصد)، ۱/۴۰ (۲/۵ درصد)، ۱/۴۰ (۲/۵ درصد) و ۰/۴۰ (۰ درصد) در نمونه ها تشخیص داده شدند (۲۴).

جباری (Jabbari) و همکاران در سال ۲۰۱۲ از واکنش زنجیره ای پلی مراز به منظور تشخیص ژن *cpb2* در تیپ های مختلف *کلستریدیوم پرفرنجنس* جدا شده از بیماری های روده ای در حیوان استفاده کردند. حضور *cpb2* در میان جدایه های *کلستریدیوم پرفرنجنس* به ترتیب در تیپ های A، B، C و D با ۵۴/۵ درصد (۶/۱۱)، ۶۲ درصد (۱۳/۲۱)، ۴۲/۸ درصد (۶/۱۴) و ۶۹/۲۵ درصد (۹/۱۳) گزارش گردید (۲۵).

احسنی (Ahsani) و همکاران (۲۰۱۰) واکنش زنجیره ای پلی مراز سه گانه (Triplex PCR) را برای شناسایی تیپ های B، C و D *کلستریدیوم پرفرنجنس* به صورت همزمان استفاده کردند. نتایج نشان داد که در تمامی نمونه ها، قطعه ۳۲۴ جفت باز مربوط به ژن کد کننده توکسین *cpa* ایجاد شده است (۱۵).

در پژوهش حاضر آزمایش میزان کشندگی توکسین اپسیلون فعال در دو گروه تیپ D کشت داده شده در محیط کشت های پایه رایج و حاوی پودر جگر به صورت In vivo مورد بررسی قرار گرفت. تا کنون فرض بر این بود که پودر جگر بر توکسین زایی *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D در سیستم غیر فرمانتوری تاثیر دارد (۲۶ و ۲۷). اما با استفاده از آزمایش MLD و نتایج این تحقیق، مشخص شد که میزان MLD در محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر اختلاف معنی داری ندارد. به عبارت دیگر اضافه کردن پودر جگر تاثیری در افزایش

جدول ۲: مقایسه نتایج حاصل از انجام آزمایش های سنجش حداقل میزان کشندگی توکسین و سنجش پروتئین حاصل از کشت *کلستریدیوم پرفرنجنس* در محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر.

نوع محیط	شماره نمونه	نتیجه آزمون			
		سنجش حداقل میزان کشندگی توکسین (میلی لیتر)		سنجش پروتئین (میلی گرم بر میلی لیتر)	
		مقدار	میانگین	مقدار	میانگین
محیط کشت پایه رایج	D_{11}	۱/۵۰۰۰	۱/۴۰۰۰	۱۱۳/۹۹۶	۹۴/۳۹
	D_{12}	۱/۳۰۰۰		۸۰/۳۴۱	
	D_{13}	۱/۴۰۰۰		۸۸/۸۲۳	
محیط کشت پایه حاوی پودر جگر	D_{21}	۱/۴۰۰۰	۱/۴۳۳۳	۴۱/۹۲۵	۴۸/۰۱
	D_{22}	۱/۳۰۰۰		۴۸/۹۴۴	
	D_{23}	۱/۶۰۰۰		۵۳/۱۷۳	

Archive of SID
www.SID.ir

مقدار توکسین اپسیلون *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D ندارد. روچا (Rocha) و همکاران در سال ۲۰۰۸ از موش هایی با وزن ۲۲–۱۸ گرم به منظور مطالعه عوامل بیماری زا با تزریق وریدی تهیه شده از مایع رویی کشت رویشی تیپ D یا توکسین اپسیلون خالص شده استفاده کردند. یافته های آنها نشان داد که تزریق وریدی مدل موش برای مطالعه اثرات سیستمیک توکسین اپسیلون مفید بوده و این گونه ها به توکسین های تیپ D حساس می باشند. همچنین آنها دریافتند که هر چه میزان MLD بیشتر باشد باکتری مورد نظر توکسین بیشتری تولید کرده می کند. بنابراین واکسن تولید شده ایمنی زایی بیشتری در دام ایجاد می کند. این امر از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می باشد (۲۸).

فرناندز میکاوا (Fernandez-Miyakawa) و همکاران، کشندگی مایع رویی محیط کشت تیمار شده با تریپسین و غیر تریپسین جدایه تیپ B *کلستریدیوم پرفرنجنس* را در تزریق وریدی به موش در آزمون MLD بررسی کردند. آنالیز همبستگی مقایسه سطوح توکسین در مایع رویی تیپ B در برابر مطالعات کشندگی و خنثی سازی هر دو نشان داد که عامل اصلی برای کشندگی بدون تیمار شدن با تریپسین، حضور cpb بوده است. مطالعات خنثی سازی نشان داد که cpb و etx هر دو بعد از تیمار شدن با تریپسین مهم هستند و حداقل قسمت cpb تولید شده توسط جدایه های تیپ B بعد از تیمار شدن با تریپسین، فعال باقی می ماند. همچنین ارتباط معنی داری بین etx، cpb2 و cpa تولید شده در in vitro در میان جدایه های تیپ B وجود داشت. این نتایج پیشنهاد می کند که احتمالاً cpb و etx هر دو مهم ترین عامل ایجاد کننده عفونت *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ B در حیوانات اهلی می باشند (۲۹).

در پژوهش حاضر مایع رویی *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D که در محیط کشت های رایج و حاوی پودر جگر رشد یافته بود با سانتریفیوژ کردن جدا و بعد از اضافه کردن تریپسین به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه و به صورت وریدی به موش تزریق شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود ندارد. به عبارت دیگر توکسین بیشتری با اضافه کردن پودر جگر تولید نشده است تا با اضافه کردن آنزیم تریپسین به توکسین فعال تبدیل شده و موش های بیشتری را بکشد.

الشوربگی (El.Shorbagy) و همکاران در سال ۲۰۱۲ آزمایش MLD را برای ارزیابی میزان کشندگی توکسین آلفا از تیپ A و توکسین اپسیلون از تیپ D در موش انجام دادند. یافته های آنها نشان داد که حداقل دوز کشندگی برای *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A، ۱ به ۱۶ و برای تیپ D، ۱ به ۱۸ می باشد. همچنین حداقل دوز کشندگی برای *کلستریدیوم پرفرنجنس*، ۰/۰۱۴ گزارش شد (۳۰). اما در مطالعه حاضر میزان توکسین اپسیلون فعال شده با تریپسین از *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D در دو محیط کشت پایه رایج و حاوی پودر جگر بررسی گردید. نتایج نشان داد که میزان MLD در محیط کشت فاقد پودر جگر ۱/۴۰۰۰ یا 10^{-3} ۰/۲۵ و در محیط کشت حاوی پودر جگر ۱/۴۳۳۳ یا 10^{-3} ۰/۲۳ می باشد. از نظر آماری تفاوت معنی داری بین این دو محیط کشت از نظر میزان سمیت توکسین اپسیلون وجود نداشت.

فهمی (Fahmy) و همکاران در سال ۲۰۱۰، MLD توکسین های *کلستریدیومی* را مورد بررسی و موش های مورد آزمایش را به مدت سه روز تحت نظر قرار دادند. آنها MLD را به عنوان بالاترین رقتی از توکسین که موش را در مدت معین شده می کشت، تعریف نمودند. نتایج نشان داد که توکسین اپسیلون از ۱/۱۰ به ۱/۱۲۰۰، برای توکسین بتا از ۱/۱۰ به ۱/۴۰۰، برای توکسین آلفای *کلستریدیوم نوآی* از ۱/۱۰ به ۱/۵۰ و برای توکسین آلفای *کلستریدیوم* سپتیکوم از ۱/۲ به ۱/۲۰ شروع می گردد (۳۱).

در این مطالعه آزمایش سنجش میزان پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری انجام شد و نتایج به صورت in vitro مورد بررسی قرار گرفتند. اسپکتروفتومتری از ابزارهای بسیار قدرتمند در آنالیز شیمیایی است (۱۷). به طور کلی در روش سنجش میزان پروتئین با استفاده از اسپکتروفتومتری، تمام پروتئین های تولید شده توسط باکتری در دو طول موج متفاوت (۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر)

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه گیری شد.

نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین میزان پروتئین تولیدی در محیط کشت پایه رایج و محیط کشت پایه حاوی پودر جگر وجود دارد. این اختلاف شاید به این علت باشد که میزان توکسین در گروهی که حاوی پودر جگر تجارتی بوده کمتر از گروه دیگر می باشد. با این وجود نمی توان گفت که نتایج مربوط به گروه فاقد پودر جگر تنها مربوط به توکسین اپسیلون است. بلکه ممکن است توکسین های دیگری نیز هنوز در محیط کشت مورد آزمایش وجود داشته که توسط اسپکتروفتومتری اندازه گیری شده اند. به همین دلیل برای نتیجه گیری قطعی توصیه می شود با روش های بیوشیمیایی میزان پروتئین مورد مقایسه قرار گیرد.

نتیجه گیری

استفاده از کیت RNX-PLUS برای استخراج RNA تام *کلستریدیوم پرفرنجنس* و نیز الکتروفورز ژل آگاروز برای نشان دادن باندهای آلفا و اپسیلون مناسب می باشد. علاوه بر این اگر به محیط کشت *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ D، پودر جگر اضافه شود ژن های آلفا و اپسیلون بیان می شوند. همچنین افزودن پودر جگر به محیط کشت پایه رایج تاثیری بر افزایش میزان توکسین ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارکنان موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه کرمان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. Ithaca and London. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press; 1998.
2. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. Veterinary microbiology and microbial disease. 2nd ed. UK. John Wiley and Sons Ltd Publication; 2011.
3. Vijay KJ, Marks H, Thippareddi HP. Model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured beef. Food J Microbiol. 2008; 25: 42-55.
4. Alnoman MM. 2011. Characterization of germination of *Clostridium perfringens* spore from various. Msc . Oregon State University.
5. Hassani Tabatabae AM, Firozi R. Bacterial Diseases of animal. Tehran. Publication University of Tehran; 2006.
6. Gokce HI, Genc O, Sozmen M, Gokce G. Determination of *Clostridium perfringens* toxin-types in sheep with suspected enterotoxemia in Kars Province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2007; 31(5): 355-360.
7. Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*. Proc Nat Aca Sci Am. 2002; 99(2): 996-1001.
8. Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes C, Naylor CE, Basak AK, Titbal RW. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. FEBS J. 2011; 278: 4589-4601.
9. Heikinheimo A. 2008. Diagnostics and molecular epidemiology of cpe-positive *Clostridium*

Archive of SID
www.SID.ir

perfringens type A. Academic dissertation. University of Helsinki.

10. Pelish TM, McClain MS. Dominant-negative inhibitors of the *Clostriduim perfringens* ε-toxin. J Biol Chem. 2009; 284(43): 29446-29453.

11. Smedley JG, Fisher DJ, Sayeed S, Chakrabarti G, McClane BA. The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. Rev Physiol Bioch. 2005; 152: 183-204.

12. Verma L. Polymerase chain reaction in ophthalmology. India. All India ophthalmological society press; 2011.

13. Souza AM, Reis JKP, Assis RA, Horta CC, Siqueira FF, Facchin S, Alvarenga ER, Castro CS, Salvarani FM, Silva ROS, Pires PS, Contigli C, Lobato FCF, Kalapothakis E. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. Genet Mol Res. 2010; 9(1): 266-276.

14. Tahmores Poor A, Salehi R, Kermanshahi RK, Eslami G. RNA extraction of *Streptococcuse mutans* biofilm cells. Microbiol Magazine Med Iran, 2010; 4: 9-14 [In Persian].

15. Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Shamsaddini MB, Ezatkhah M, Darakhshan MH. Using technique recognize triplex PCR types B, C, D of *Clostridium perfringens*. Iran J Animal Sci Res. 2010; 2(2): 184-189 [In Persian].

16. Ahsani MR, Shamsaddini Bafti M, Esmailizadeh AK, Mohammadabadi MR. Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Rumin Res. 2011; 95: 65-69.

17. Paktinat M, Khodabandeh M, Amiri BM, Farahmand H. 2012. A simple method for purification of low levels of Beluga (Huso huso) Vitellogenin, International Conference on Applied Life Sciences. 10-12 Sep, Turkey. 65-71.

18. Mazoochi T, Khamehchian T, Mousavi S. The Effect of ascorbic acid on expression of Bax and Bcl-2 and In vitro maturation of mouse prenatal follicles isolated from vitrified and non-vitrified ovaries . ISMJ. 2010; 13(3): 151-162.

19. Haddad F, Qin AX, Giger JM, Guo H, Baldwin KM. Potential pitfalls in the accuracy of analysis of natural sense-antisense RNA pairs by reverse transcription-PCR. BMC Biotech. 2007; 7: 21.

20. Nuyts S, Mellaert LV, Lambin P, Anne J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. J Microbiol Meth. 2001; 44: 235-238.

21. Osman KM, EI-Enbaawy MI, Hassan HM, Ezzeldin NA, Hussein HMG. A rapid screening identification of *Clostridium perfringens* Alpha and Epsilon toxins recovered from mastitic bovine milk by SDS-PAGE electrophoresis. Adv Natural Appl Sci. 2009; 3(2): 253-259.

22. Badagliacca P, Provvido A, Scattolini S, Pompei G, Giannatale E. Toxin genotyping of *Clostridium perfringens* strains using a polymerase chain reaction protocol. Vet Italiana. 2010; 46(1): 113-118.

23. Wang G, Zhou J, Zheng F, Lin G, Cao X, Gong X, Qiu C. Detection of different genotypes of *Clostridium perfringens* in feces of healthy dairy cattle from china using real-time duplex

Archive of SID

www.SID.ir

PCR assay. Pak Vet J. 2010; 31(2): 120-124.

24. Mohamed ME, Suelam II, Saleh MA. The presence of toxin genes of *Clostridium perfringens* isolated from camels and humans in Egypt. Veterinarski Arhiv. 2010; 80(3): 383-392.

25. Jabbari AR, Tekyei F, Esmaelizad M, Pilehchian Langroudi R. Occurrence of beta2 toxigenic *Clostridium perfringens* isolates with different toxin types in Iran. Arch Razi Inst. 2012; 67(2): 133-137.

26. Ardehali M, Pilehchian Langroudi R, Mossavi M, Farzan A. Survey of prepare polyvalent enterotoxaemia vaccine of sheep and goat by absorbed of toxoid with aluminum hydroxide. Final report of Razi Vaccine and Serum Research Institute. 1999; 183 [In Persian].

27. The FAO. Production of backleg vaccine general laboratory procedures, Italy. Available at: http://www.fao.org/docrep/004/t0278e/t0278e02.htm (Accessed 1991).

28. Rocha PH, Assis RA, Lobato FCF, Cardoso VN, Heneine LGD. Stability and toxicity of *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin treated by iodine. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008; 60(4): 821-824.

29. Fernandez-Miyakawa ME, Sayeed S, Fisher DJ, Poon R, Adams V, Rood JI, McClane BA. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection. Am Soc Microbiol. 2007; 75(9): 4282-4288.

30. El-Shorbagy MM, Reda LM, Mona H. Prevalence of *Clostridium perfringens* Alpha toxin in processed and unprocessed fish. Int J Microbiol Res. 2012; 3(3): 195-199.

31. Fahmy AFS, Mohamed KF, Samir A, Ashgan MH, Azab AMH, Selim SA. Preparation of a combined vaccine for clostridial diseases and rabies in sheep. Global Veterinaria. 2010; 4(5): 463-473.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 1, April 2014

Original Article

Toxicity effects of alpha (α) and epsilon (ε) toxins produced by *Clostridium perfringens* type D

Mahnaz Karimi[1], Mehrdad Shamsaddini Bafti[2], Majid Ezzatkhah[3], Mohammad Kargar[4]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University Jahrom, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Research and Development of Biological Products, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Kerman, Iran.
[3] Lecturer, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Kerman, Iran.
[4] Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Clostridium perfringens* is one of the most pathogenic species in the *clostridium* genus. Alpha (α) and epsilon (ε) are the main toxins of this bacteria. This study aimed to express the genes encoding alpha and epsilon toxins of *C. perfringens* type D in two media (in the base medium and the base medium containing liver powder) and to analyze their toxicity.

Materials and Methods: The standard strain was inoculated in the base enrichment medium, which half of them were enriched by powder liver. Then, RNAs were extracted and after converting to cDNA using double polymerase chain reaction, the gene expression was investigated on gels. The level of protein expression was measured by spectrophotometery and the cell toxicity of these proteins was determined by minimum lethal dose (MLD) assay.

Results: The electrophoresis of PCR products showed two bands, 324 and 625, which represented successful expression of the genes encoding of alpha and epsilon toxins in both media. The mean cell cytotoxicity of the proteins expressed in the base medium and the base medium containing liver powder were measured 1/4000 and 1/4333, respectively. The mean protein production in the base medium and the base medium containing liver powder were measured 94.39 and 48.01 mg/ml.

Conclusions: This study showed that these genes are expressed in the presence of liver powder. Furthermore, based on the MLD assay in these media, although these genes expressed the genes in the presence of liver powder, this additives did not had any effects on their toxicity.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Culture media, Gene expression, Toxin, Liver powder.

Correspondence to: Mehrdad Shamsaddini Bafti

Tel: +989133980638

E-mail: m.shamsaddini@rvsri.ac.ir

Journal of Microbial World 2014, 7(1): 38-48.

Archive of SID

www.SID.ir