تعیین تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از گوسفند در منطقه‌ی اهواز

داریوش غریبی[۱*]، مسعود قربانپور[۲]، محمدرحیم حاجی‌حاجیکلایی[۳] و زهره محمودی‌کوهی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۹

چکیده

کلستریدیوم پرفرینجنس باکتری پاتوژن مهمی است که باعث بیماری‌های مختلفی در دام‌ها می‌شود. این باکتری در ۵ تیپ A، B، C، D و E طبقه‌بندی می‌شود. تیپ D *کلستریدیوم پرفرینجنس* عامل ایجاد بیماری آنتروتوکسمی در دام‌ها است. هدف از این مطالعه تعیین تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* در منطقه‌ی اهواز بود. ۳۶۹ نمونه مدفوع به صورت تصادفی از گوسفندان این منطقه، جمع‌آوری گردید. پس از آماده‌سازی و کشت نمونه‌ها در محیط آگار خون‌دار حاوی نئومایسین، باکتری‌های مظنون به *کلستریدیوم پرفرینجنس* با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی تعیین هویت شدند. در مجموع از ۳۶۹ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده، با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، تعداد ۵۶ جدایه مظنون به *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداسازی و شناسایی گردید. برای تأیید مولکولی جدایه‌ها، DNA این جدایه‌ها استخراج و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توکسین آلفا، تأیید مولکولی جدایه‌ها با PCR صورت گرفت. نتایج نشان داد که از ۵۶ جدایه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس*، ۵۴ جدایه به عنوان *کلستریدیوم پرفرینجنس*تأیید ملکولی شدند. تعیین تیپ این جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اگزوتوکسین‌های پنج‌گانه‌ی تیپ‌های مختلف این باکتری صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که از مجموع ۵۴ جدایه، به ترتیب ۱۰ (۱۸/۵۲ درصد)، ۴ (۷/۴۱ درصد)، ۲۴ (۴۴/۴۴ درصد) و ۱۶ جدایه (۲۹/۶۳ درصد)، تیپ A، تیپ B، تیپ C و تیپ D می‌باشند. بنابراین شایع‌ترین تیپ‌های این باکتری در این منطقه‌ی تیپ‌های C و D هستند. در این مطالعه، هیچ یک از جدایه‌ها واجد ژن توکسین یوتا و نیز ژن آنتروتوکسین نبودند.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم پرفرینجنس*، PCR، ژنوتیپ، گوسفند، اهواز

مقدمه

کلستریدیوم پرفرنجنس باکتری میله‌ای گرم مثبت، بی‌هوازی، غیرمتحرک و اسپورزایی است که توزیع جهانی دارد و حیوانات مختلفی از جمله گاو، گوسفند، بز و خوک را متأثر می‌سازد. چهار گروه اصلی توکسین که نقش اصلی را در پاتوژنز بیماری بر عهده دارند شامل توکسین‌های آلفا (α)، بتا (β)، اپسیلون (□) و یوتا (Iota) می‌باشند که به ترتیب توسط ژن‌های cpa، cpb، etx و iap رمز گذاری شده و اساس طبقه‌بندی *کلستریدیوم پرفرنجنس* به پنج تیپ مختلف (A، B، C، D و E) را تشکیل می‌دهند. تیپ‌های مختلف این باکتری عامل بیماری‌های مختلفی هستند که به خصوص تیپ D آن در نشخوارکنندگان حائز اهمیت است. انواع تیپ‌های A، B، C و E آن بیش‌تر دام‌های جوان را درگیر می‌سازند ولی تیپ D بیش‌تر دام‌های بالغ را بیمار می‌سازد. این باکتری معمولاً به میزان کم در دستگاه گوارش دام‌های سالم هم یافت می‌شود و هنگامی که شرایط تکثیر بیش از حد آن

[۱*] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: d.gharibi@scu.ac.ir

[۲] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۴] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

Archive of SID

www.SID.ir

فراهم شود بیماری عارض می‌گردد آنتروتوکسمی بیماری عفونی حاد و غیرمسری است که از دستگاه گوارش منشاء می‌گیرد (Markey et al. 2013, Timoney et al. 1988, Uzal et al. 2008, 2010). روش‌های تشخیصی این باکتری بر اساس شکل پرگنه، آزمایش‌های بیوشیمیایی، روش‌های خنثی‌سازی توکسین، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی، الایزا، سیستم‌های تجاری مانند AP ۱۲۰ A و یا سیستم‌های Rapid ID 32A، کروماتوگرافی گازی برای مشخص نمودن سیمای اسیدهای آلی و روش‌های ملکولی استوار است. در روش‌های مولکولی بررسی توالی ژنومی کامل تعدادی از سویه‌های *کلستریدیوم پرفرنجنس* نشان‌دهنده‌ی درجه‌ی بالایی از تنوع ژنومی در این ارگانیسم است. در سویه‌های بیماری‌زا این باکتری بیش از ۳۰۰ سکانس ژنی منحصر به فرد با ویژگی‌هایی که منجر به بروز الگوهای مختلف حدت و اشکال متفاوت بیماری می‌شوند، شناسایی شده‌اند که این ویژگی‌ها شامل عوامل حرکت، توانایی‌های متابولیکی، کپسول‌های خارج سلولی، توکسین‌ها و سایر آنزیم‌های ترشح شده توسط باکتری هستند. شناسایی باکتری مبتنی بر حضور و یا تعیین توالی ژن‌های مربوط به چهار سم اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا روش اختصاصی و موفقیت‌آمیز برای تشخیص سریع باکتری و درمان مناسب بیماری‌های ناشی از آن است که از یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر کدام از ژن‌های توکسین‌های اصلی باکتری استفاده می‌شود. این روش با توجه به مزایای آن می‌تواند روش مناسب و دقیقی برای جایگزین نمودن آن با دیگر روش‌ها جهت شناسایی بیماری‌های ناشی از باکتری *کلستریدیوم پرفرنجنس* در انسان و حیوانات باشد (Markey et al. 2013).

از آن جا که معمولاً دام‌های مبتلا به درمان پاسخ نمی‌دهند، کنترل و پیش‌گیری از بیماری‌های ناشی از این عامل، بیش‌تر با اعمال مدیریت صحیح پرورش و واکسیناسیون با توکسوئید (به تنهایی) و یا توکسوئید و باکترین (کشت کامل) صورت می‌پذیرد. چون شیوع انواع تیپ‌ها در مناطق مختلف متفاوت است و همچنین میزان توکسین‌زایی در سویه‌های مختلف، می‌تواند متفاوت باشد؛ مطالعه و تحقیق بر روی جدایه‌های محلی جهت استفاده در واکسن ضرورت دارد. مطالعه‌ی حاضر با هدف شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از گوسفندان به ظاهر سالم کشتار شده در کشتارگاه اهواز و نیز گوسفندان مشکوک به آنتروتوکسمی و ارجاعی به بیمارستان آموزشی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز صورت پذیرفت تا ضمن مشخص شدن تیپ‌های موجود در منطقه، از این جدایه‌ها در مطالعات آتی مربوط به تحقیقات واکسن استفاده شود. بررسی منابع نشان داد تا کنون مطالعه‌ی منتشر شده‌ای در این خصوص در خوزستان و اهواز انجام نشده است.

مواد و روش کار

جهت نمونه‌گیری و کشت، در مدت ۳ ماه، تعداد ۳۶۹ نمونه مدفوع از گوسفندان به ظاهر سالم از ۵ منطقه‌ی اهواز بر حسب موقعیت جغرافیایی شامل جاده‌ی خرمشهر، جاده‌ی ملاثانی، جاده‌ی آبادان، جاده‌ی اندیمشک و جاده‌ی حمیدیه، گوسفندان ارجاعی و کشتار شده در کشتارگاه اهواز و گوسفندان مشکوک به آنتروتوکسمی و ارجاعی به بیمارستان آموزشی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز جمع‌آوری گردید. در مورد گوسفندان ارجاعی به کشتارگاه، جمع‌آوری نمونه‌ی مدفوع حیوانات مورد نظر، از مقعد یا روده‌ی بزرگ صورت گرفت و در مورد گوسفندان مشکوک به انتروتوکسمی نمونه‌های مدفوع اسهالی دام‌های زنده ارجاعی یا در موارد کالبدگشایی نمونه‌ی محتویات روده در ظروف نمونه‌گیری اخذ گردید و به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال یافتند. در آزمایشگاه، ۴-۳ گرم از مدفوع به طور کامل در ۴ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل شد و پس از هموژن شدن کامل، مخلوط به مدت کوتاهی برای ته‌نشین

Archive of SID

www.SID.ir

شدن مواد درشت مدفوع در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. از مایع رویی، در کنار شعله ۲ تا ۳ لوپ کامل درون محیط تیوگلیکولات کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی در انکوباتور قرار گرفت. در ادامه، ۵۰ میکرولیتر از محتویات قسمت عمقی محیط تیوگلیکولات برداشت گردید و در کنار شعله در محیط - آگار خون‌دار محتوی ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نئومایسین کشت چهار منطقه‌ای داده شد (Wen Qiyi 2004). نمونه‌های کشت شده به همراه پلیت کشت داده شده از *کلستریدیوم پرفرینجنس* به عنوان کنترل مثبت در جار بی-هوازی قرار داده می‌شدند و با متصل کردن جار به دستگاه ایجاد کننده‌ی شرایط بی‌هوازی (Don Whitley Scientific, UK)، در جار شرایط بی‌هوازی ایجاد و سپس جار به مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه‌ی ۳۷ درجه‌ی سانتی-گراد قرار می‌گرفت (Quinn et al. 1994, Markey et al. 2013).

پلیت‌ها از نظر کلنی‌های مشکوک به *کلستریدیوم پرفرینجنس* (واجد همولیز دوگانه در سطح پلیت) بررسی گردیدند و جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های مظنون، در محیط آگار خون‌دار جدید صورت گرفت. با انجام رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز و اکسیداز بر روی پرگنه‌های مشکوک خالص شده و تحت کشت آن‌ها در محیط آگار زرده‌ی تخم‌مرغ حاوی نئومایسین (Wen Qiyi 2004)، باسیل‌های گرم مثبت و اکسیداز و کاتالاز منفیِ تولید کننده‌ی لسیتیناز به عنوان جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهدای شدند.

جهت استخراج DNA جدایه‌های مظنون به *کلستریدیوم پرفرینجنس* از روش جوشاندن استفاده گردید. پس از خارج کردن جدایه‌ها از فریزر، کشت آن‌ها بر روی آگار خون‌دار انجام گرفت. جهت استخراج DNA، ۳-۲ پرگنه باکتری از باکتری‌های رشد کرده، در ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل قرار داده می‌شد و پس از ورتکس کوتاه، نمونه‌ها در ترموبلاک با دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار می‌گرفتند، تا باکتری‌ها لیز شوند. بعد از آن نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ می‌گردیدند. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ به عنوان DNA الگو، برداشته می‌شد و در میکروتیوب‌های استریل تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌گردیدند (Ausubel et al. 1992).

از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مربوط به توکسین α *کلستریدیوم پرفرینجنس* برای تأیید مولکولی جدایه‌های مشکوک به *کلستریدیوم پرفرینجنس* استفاده گردید (Heikinhelm et al. 2005). توالی پرایمرهای مربوطه در جدول ۳ درج شده است.

واکنش PCR با استفاده از Master Mix 2x (آمپلیکون- دانمارک) انجام شد. از DNA استخراج شده *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A به عنوان کنترل مثبت در آزمایش PCR استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر در چند مرحله انجام گردید که اجزای آن در جدول ۱ درج شده است.

جدول ۱: اجزا و مقادیر واکنش PCR جهت تکثیر ژن توکسین آلفای *کلستریدیوم پرفرینجنس*

اجزای واکنش	حجم مورد استفاده (میکرولیتر) در هر واکنش
مستر میکس* 2X	۱۲/۵
آغازگر پیشرو (۱۰میکرومولار)	۲/۵
آغازگر معکوس (۱۰میکرومولار)	۲/۵
DNA	۳
آب	۴/۵
مجموع	۲۵

* ترکیب ۳ میلی‌مولار کلرور منیزیوم، ۰/۴ میلی‌مولار dNTP و ۰/۲ واحد در میکرولیتر DNA پلی‌مراز Taq

Archive of SID

www.SID.ir

برای هر واکنش PCR، در ابتدا مواد فوق با مقادیر ذکر شده (به استثنای DNA)، در مجاورت یخ به صورت مخلوط تهیه می‌گردید و سپس میزان ۲۲ میکرولیتر از مخلوط اجزای واکنش به درون میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری مخصوص PCR که عاری از DNase بودند منتقل می‌شد. متعاقباً مقدار ۳ میکرولیتر از DNA جدایه-های مشکوک به صورت جداگانه به هر میکروتیوب منتقل گردیدند و پس از مخلوط کردن آن با محتویات درون میکروتیوب درب آن بسته و کدگذاری می‌گردید. میکروتیوب‌ها به دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf, Germany) منتقل و برنامه‌ی دمایی مندرج در جدول ۲ اجرا می‌شد که در صورت فراهم بودن شرایط مناسب و تکثیر موفق، آغازگرها قطعه‌ای به طول ۴۰۰bp را تکثیر می‌نمودند (Heikinhelm et al. 2005).

جدول ۲: برنامه‌ی دمایی و تعداد سیکل‌ها مربوط به تکثیر ژن توکسین α *کلستریدیوم پرفرینجنس*

سیکل‌ها	مراحل	دما °C	زمان	تعداد سیکل‌ها
سیکل اول	دناتوره شدن اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
سیکل دوم	دناتوره شدن	۹۴°C	۶۰ ثانیه	۳۵
	اتصال آغازگرها	۵۵°C	۶۰ ثانیه	
	سنتز	۷۲°C	۶۰ ثانیه	
سیکل سوم	سنتز نهایی	۷۲°C	۱۰ دقیقه	۱

جهت تعیین تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* با PCR چندگانه، PCR چندگانه در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام می‌شد که اجزای واکنش در جدول ۴ آورده شده است. در هر واکنش از پرایمرهای اختصاصی مربوط به توکسین‌های اصلی و انتروتوکسین *کلستریدیوم پرفرینجنس* (جدول ۳) استفاده می‌گردید. از DNA استخراج شده *کلستریدیوم پرفرینجنس* (تیپ‌های A، D و C) به عنوان کنترل مثبت در آزمایش PCR چندگانه استفاده گردید. برای هر واکنش PCR، در ابتدا مواد فوق با مقادیر ذکر شده (به استثنای DNA)، در مجاورت یخ به صورت مخلوط تهیه می‌گردید و سپس میزان ۴۵ میکرولیتر از مخلوط اجزای واکنش به درون میکروتیوب-های ۰/۲ میلی‌لیتری مخصوص PCR که عاری از DNase بودند، منتقل می‌شد. متعاقباً مقدار ۵ میکرولیتر از DNA جدایه‌ها به صورت جداگانه به هر میکروتیوب منتقل و پس از مخلوط کردن آن با محتویات درون میکروتیوب درب آن بسته و کدگذاری می‌گردید. میکروتیوب‌ها پس از آماده شدن به دستگاه ترمال سایکلر منتقل می‌شدند و برنامه‌ی حرارتی مشابه مرحله‌ی قبل (جدول ۲) اجرا می-شد. در صورت فراهم بودن شرایط و تکثیر موفق، آغازگرهای Cpa، Cpb، Etx، CpE و Ia به ترتیب قطعاتی به طول‌های ۳۸۱، ۱۹۵، ۶۵۵، ۲۳۲ و ۴۴۳ را تکثیر می-نمودند (Heikinhelm et al. 2005).

از آنجایی که توکسین اپسیلون و بتا نقش مهمی را در تعیین تیپ‌های B و C *کلستریدیوم پرفرینجنس* دارند، واکنش PCR دوگانه با استفاده از پرایمرهای ژن‌های توکسین‌های بتا و اپسیلون، برای کمک به تیپ‌بندی جدایه‌ها نیز صورت گرفت. جدول ۵ اجزای واکنش فوق را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای به کار برده شده تعیین تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*

ژن	توالی نوکلئوتیدی آغازگر	اندازه محصول	منبع
Cpa	F:5¹ - TGCATGAGCTTCAATTAGGT -3¹ R: 5¹ - TTAGTTTTGCAACCTGCTGT -3¹	۳۸۱	Heikinhelm، ۲۰۰۵
Cpb	F:5¹ - GCGAATATGCTGAATCATCTA-3¹ R:5¹ -GCAGGAACATTAGTATATCTTC-3¹	۱۹۵	
Etx	F:5¹ - GCGGTGATATCCATCTATTC -3¹ R: 5¹ - CCACTTACTTGTCCTACTAAC -3¹	۶۵۵	
CpE	F:5¹ - GGAGATGGTTGGATATTAGG -3¹ R:5¹ - GGACCAGCAGTTGTAGATA -3¹	۲۳۲	
Ia	F:5¹ - ACTACTCTCAGACAAGACAG -3¹ R: 5¹ - CTTTCCTTCTATTACTATACG -3¹	۴۴۳	

جدول ۴: اجزا و مقادیر واکنش PCR چندگانه جهت تعیین تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*

اجزای واکنش	حجم نهایی(میکرولیتر)
مستر میکس ۲X	۲۵
آغازگر پیشرو Cpa (۱۰میکرومولار)	۲/۵
آغازگر معکوسCpa (۱۰میکرومولار)	۲/۵
آغازگر پیشروCpb (۱۰میکرومولار)	۱/۸
آغازگر معکوسCpb (۱۰میکرومولار)	۱/۸
آغازگر پیشروEtx (۱۰میکرومولار)	۲/۲
آغازگر معکوسEtx (۱۰میکرومولار)	۲/۲
آغازگر پیشروCpE (۱۰میکرومولار)	۱/۷
آغازگر معکوسCpE (۱۰میکرومولار)	۱/۷
آغازگر پیشروIa (۱۰میکرومولار)	۲/۶
آغازگر معکوسIa (۱۰میکرومولار)	۲/۶
DNA	۵
مجموع	۵۰

جدول ۵: اجزاء و مقادیر واکنش PCR دوگانه جهت مشخص شدن توکسین‌های آلفا و بتا

اجزای واکنش	حجم نهایی (میکرولیتر)
مستر میکس ۲X	۱۲/۵
آغازگر پیشروCpb (۱۰میکرومولار)	۲/۵
آغازگر معکوسCpb (۱۰میکرومولار)	۲/۵
آغازگر پیشروEtx (۱۰میکرومولار)	۲/۲
آغازگر معکوسEtx (۱۰میکرومولار)	۲/۲
DNA	۳/۱
مجموع	۲۵

Archive of SID

www.SID.ir

برنامه دمایی و تعداد سیکل‌های تکثیر ژن‌های مربوط به توکسین‌های آلفا و بتای *کلستریدیوم پرفرینجنس* مشابه روش قبل (جدول ۲) بود.

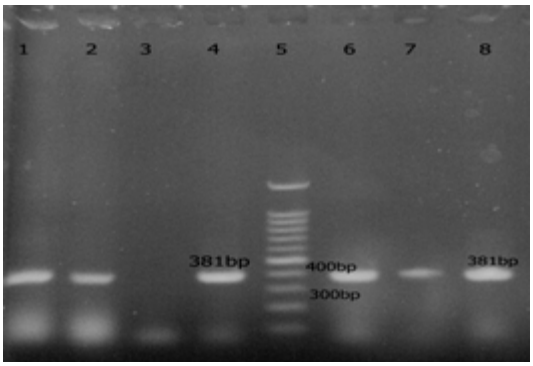
نتایج

جداسازی جدایه‌ها

در مجموع با در نظر گرفتن مورفولوژی و ویژگی‌های بیوشیمیایی، از تعداد ۳۶۹ نمونه مدفوع گرفته شده، ۵۶ جدایه مشکوک به *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شد. از این ۳۶۹ نمونه ۱۵ نمونه مربوط به موارد ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی با علایم اسهال، اسیدوز و بی‌حالی بودند که از این تعداد، ۹ جدایه‌ی مشکوک به *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شد.

تعیین هویت مولکولی جدایه‌ها

نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن توکسین آلفا که در همه‌ی تیپ‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* وجود دارد، نشان داد که از ۵۶ جدایه‌ی مظنون به *کلستریدیوم پرفرینجنس*، ۵۴ جدایه واجد ژن فوق بودند (شکل ۱).

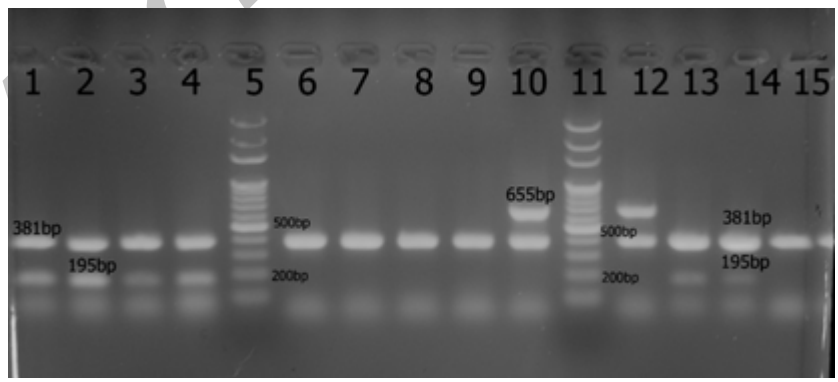


شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR جستجوی ژن توکسین آلفا *کلستریدیوم پرفرینجنس* در تعدادی از جدایه‌های مظنون به *کلستریدیوم پرفرینجنس*.

گودهای شماره ۱، ۲، ۴، ۶، ۷ جدایه‌های واجد ژن توکسین آلفا، گوده شماره ۳ کنترل منفی، گوده شماره ۸ کنترل مثبت و گوده شماره ۵ مارکر مولکولی ۱۰۰bp می‌باشند.

تعیین تیپ جدایه‌ها

جستجوی ژن‌های مربوط به توکسین‌های اصلی *کلستریدیوم پرفرینجنس* با استفاده از ۴ زوج پرایمرهای اختصاصی آن‌ها نشان از حضور تیپ‌های A، C و D در ۵۴ جدایه‌ی مورد آزمایش داشت (شکل ۲).



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR چندگانه جستجوی ژن‌های اصلی *کلستریدیوم پرفرینجنس* در تعدادی از جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*.

گوده‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۱۳ نشان دهنده وجود ژن‌های مربوط به توکسین های آلفا و بتا است (تیپ C). گوده‌های شماره ۶، ۷، ۸ و ۹ وجود تنها ژن توکسین آلفا (تیپ A) را نشان می‌دهد، گوده‌ی شماره ۱۰ وجود ژن‌های آلفا و اپسیلون (تیپ D) را نشان می‌دهد، گوده‌های شماره ۱۲، ۱۵ و ۱۴ به ترتیب کنترل‌های مثبت تیپ‌های D، A و C و گوده‌های شماره ۵ و ۱۱ مارکر مولکولی(۱۰۰bp) می‌باشند.

Archive of SID

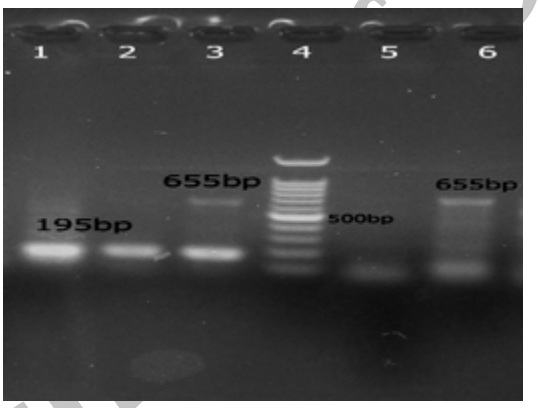
www.SID.ir

PCR دوگانه با استفاده از پرایمرهای ژن‌های توکسین‌های بتا و اپسیلون، برای کمک به تیپ‌بندی جدایه‌ها، حضور تیپ B در برخی جدایه‌ها را نشان داد (شکل ۳).

از تعداد ۱۵ مورد گوسفندان ارجاعی مشکوک به انتروتوکسمی به بیمارستان دامپزشکی، در آزمایش‌های بیوشیمیایی ۹ مورد مشکوک به *کلستریدیوم پرفرنجنس* بودند که از این ۹ مورد دو مورد متعلق به تیپ B، دو مورد تیپ C و دو مورد تیپ D *کلستریدیوم پرفرنجنس* تشخیص داده شدند. جدول ۶ تعداد دام‌های نمونه‌گیری شده و تیپ مولکولی ۵۴ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس* در این تحقیق را نشان می‌دهد.

تلفیق کلی نتایج نشان داد که از ۵۴ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس*، ۱۰ جدایه تیپ A (۱۸/۵۲ درصد)؛ تیپ B ۴ جدایه (۷/۴۱ درصد)؛ ۲۴ جدایه تیپ C (۴۴/۴۴ درصد) و ۱۶جدایه تیپ D (۲۹/۶۳ درصد) می‌باشند (جدول ۶).

همان طور که در جدول آمده است، در این پژوهش تیپ C تیپ غالب را در گوسفندان منطقه‌ی اهواز تشکیل می‌دهد. وجود ژن توکسین یوتا (iap) و ژن آنتروتوکسین در هیچ یک از جدایه‌ها تشخیص داده نشد؛ در واقع فراوانی تیپ E در بین این جدایه‌ها صفر درصد بود.



شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR دوگانه جستجوی ژن‌های بتا و اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنس* در تعدادی از جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*.

گوده‌های شماره ۱ و ۲ صرفاً تکثیر ژن توکسین بتا را نشان می‌دهد. گوده‌ی شماره ۳ تکثیر ژن مربوط به توکسین‌های بتا و اپسیلون (تیپ B) را نشان می‌دهد. گوده‌ی شماره ۵ کنترل منفی و گوده‌ی شماره ۶ تکثیر ژن اپسیلون به تنهایی و گوده‌ی شماره ۴ مارکر مولکولی ۱۰۰bpرا نشان می‌دهند.

جدول ۶: شیوع *کلستریدیوم پرفرینجنس* **و تیپ‌های مختلف آن در نمونه‌های مورد بررسی (اعداد داخل پرانتز درصد شیوع را نشان می‌دهد)**

نوع نمونه	مدفوع دام‌های زنده				نمونه روده‌ای از کشتارگاه				موارد ارجاعی به بیمارستان و کالبدگشایی شده				جمع
تعداد نمونه	۱۸۶(۵۰/۴ درصد)				۱۶۸(۴۵/۵)				۱۵(۴/۱ درصد)				۳۶۹
موارد مثبت از نظر *کلستریدیوم پرفرینجنس*	۲۰(۳۷ درصد)				۲۵(۴۶/۳)				۹(۱۶/۷ درصد)				۵۴(۱۴/۶)
تیپ مولکولی جدایه ها	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
	۴(۲۰)	۱(۵)	۷(۳۵)	۸(۴۰)	۶(۲۴)	۱(۴)	۱۵(۶۰)	۳(۱۲)	۰(۰)	۲(۲۲/۲۲)	۲(۲۲/۲۲)	۵(۵۵/۵۵)	

www.SID.ir

جدول ۷: فراوانی تیپ‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* در ۵۴ جدایه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از منطقه‌ی اهواز

تیپ باکتری	تعداد جدایه‌ها	درصد فراوانی
A	۱۰	۱۸/۵۲
B	۴	۷/۴۱
C	۲۴	۴۴/۴۴
D	۱۶	۲۹/۶۳
جمع کل	۵۴	۱۰۰

بحث

توکسین‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* مسئول ایجاد آنتروتوکسمی در گوسفند هستند (Mc Orist et al. 2002). آنتروتوکسمی‌های کلستریدیایی، بیماری‌های حاد و کشنده‌ای هستند که گوسفند، بره‌ها، گوساله‌ها، توله خوک‌ها و گاهی کره اسب‌ها را مبتلا می‌سازند (Markey et al. 2013). این بیماری ممکن است به وسیله‌ی هر ۵ تیپ *کلستریدیوم پرفرینجنس* ایجاد شود (طباطبایی و فیروزی ۱۳۸۴، Forbes and Sahm 2002, Toply and Wilson 1998). در حال حاضر واکسیناسیون در مقابل این بیماری راه پیش‌گیری اصلی برای کاهش خسارت و یا به حداقل رساندن شدت آنتروتوکسمی است (De la Rosa et al. 1997, MiChaud et al. 2007). واکسن‌ها باید قابلیت محافظت کافی در برابر همه تیپ‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* موجود در منطقه را دارا باشند (Forbes and Sahm 2002). از آنجایی که تعیین تیپ عواملی از این نوع، جهت ارائه یک برنامه‌ی کنترلی دقیق مورد نیاز است (Michaud et al. 2007) در مطالعه‌ی حاضر بررسی فراوانی تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* مد نظر قرار گرفت تا بتوان از اطلاعات حاصله در پیش‌گیری و کنترل بیماری‌های ناشی از آن استفاده کرد.

در این مطالعه درمجموع از حدود ۱۴/۶ درصد نمونه‌های مدفوع *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شد که با مطالعات مشابه هم‌خوانی نسبی دارد. در طی مطالعه‌ی Moussa و Hessan که در سال ۲۰۱۱ در عربستان انجام شده است، در ۲۷ نمونه (۱۸ درصد) از ۱۵۰ نمونه مدفوع حیوانات بیمار با روش PCR حضور *کلستریدیوم پرفرینجنس* گزارش شده است. در کرمان Ahsani و همکاران در سال ۲۰۱۰، ۲۳ جدایه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* (۱۷/۷ درصد) از ۱۳۰ نمونه‌ی مدفوع گوسفند سالم جداسازی شده است. تفاوت جزئی در میزان آلودگی مدفوع گوسفند به این باکتری را می‌توان به تفاوت در روش کار و یا موقعیت‌های زمانی و مکانی مختلف آن‌ها نسبت داد.

در مطالعه‌ی حاضر تأیید اولیه‌ی تیپ‌های باکتریایی مورد استفاده با روش بیوشیمیایی صورت گرفت، که از ۵۶ جدایه‌ی مظنون ۵۴ جدایه در PCR هم *کلستریدیوم پرفرینجنس* تشخیص داده شد که دال بر هم‌خوانی بسیار خوب این دو روش و قابل اعتماد بودن روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت این باکتری است. چه بسا اگر از آزمون‌های بیوشیمیایی بیش‌تری استفاده می‌شد، تطابق بیش‌تری هم بین دو روش یاد شده وجود می‌داشت. به هر حال روش‌های بیوشیمیایی تشخیص *کلستریدیوم* زمان‌بر (۲۴ تا ۷۲ ساعت) بوده و با توجه به تطابق خیلی زیاد بین این دو روش در مواردی که سرعت تشخیص اهمیت داشته باشد استفاده از PCR توصیه می‌شود (Grevelding 1996, Kalender et al. 2005).

در این پژوهش در بین جدایه‌های به دست آمده از کشت مدفوع گوسفند، بیش‌ترین فراوانی مربوط به تیپ C *کلستریدیوم پرفرینجنس* (۴۴/۴ درصد) بود. Ahsani و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز در کرمان تیپ C را به عنوان تیپ غالب آن منطقه معرفی کرده‌اند ولی در اکثر گزارش‌های دیگر (Alver and kurtkaya 1989, Deligaris 1978, Hadimli et al. 2011, Itodo et al. 1986, Kalender 2005, Moussa and Hessan 2011, Ozcan and Gurcay 2000, Popoff 1984)، تیپ A، تیپ غالب جداسازی شده از مدفوع گوسفند بوده است. به نظر می‌رسد منطقه‌ی جغرافیایی در شیوع تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم*

Archive of SID

www.SID.ir

پرفرینجنس نقش به سزایی داشته باشد و عدم هم‌خوانی این بخش از نتایج مطالعه‌ی پیش رو با مطالعات مذکور به این مهم مربوط باشد. لازم به ذکر است که در مطالعه‌ی Ahsani و همکاران در سال ۲۰۱۰ ادعا شده است که برای اولین بار حضور *کلستریدیوم پرفرینجنس* نوع A در ایران گزارش می‌شود.

در تحقیق حاضر در بین ۵۴ جدایه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* به دست آمده از کشت مدفوع گوسفند، هیچ کدام متعلق به تیپ E نبودند که با توجه به مطالعات انجام شده در ایران (Ahsani et al. 2010) این نتیجه دور از انتظار نبود چرا که تا کنون از ایران جداسازی این تیپ گزارش نشده است. هم‌سو با یافته‌ی فوق *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ‌های A، B، C و D از گوسفندان مبتلا به آنتروتوکسمی در ترکیه جداسازی شده‌اند، اما تیپ E گزارش نشده است (Gurcay and Ozcan 2000, Kurtkaya and Alver 1989). Ahsani و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کرمان با جداسازی و تعیین ژنوتیپ *کلستریدیوم پرفرینجنس* به روش Multiplex PCR در گوسفندان منطقه‌ی فوق جداسازی انواع تیپ‌های A، B، C و D را گزارش نموده‌اند ولی تیپ E را جداسازی ننموده‌اند. شایان ذکر است که در مطالعه‌ی پیش‌رو علی‌رغم تلاش‌های فراوان در دسترسی به DNA *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ E و یا جداسازی آن از مدفوع خرگوش، استفاده از این تیپ در کنترل مثبت‌های PCR میسر نگردید و احتمال کمی هم وجود دارد که عدم گزارش این تیپ در مطالعه‌ی حاضر به نامناسب بودن شرایط PCR مربوط باشد، هر چند که شرایط فوق بر اساس منابع انتخاب گردیده بود و بسیار بعید است که این مشکل مطرح باشد. به هر حال هر چند بعید است ولی ممکن است برخی از تیپ‌های A تشخیص داده شده در اصل تیپ E بوده باشند.

در این پژوهش ژن آنتروتوکسین در هیچ جدایه‌ای دیده نشد . در تأیید نتیجه‌ی فوق، حضور ژن آنتروتوکسین در جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از بره‌ها (Gkiourtzidis et al. 2001)، گوسفند (Kalender et al. 2005)، ماکیان (Engstrom and Fermer 2003)، خوک (kalender et al. 2005, kanakaraj et al. 1998) نیز اثبات نشده است. هر چند جداسازی جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تولید کننده آنتروتوکسین در اسب و گاو گزارش شده است (Tschirdewahn et al. 1991).

در مجموع می‌توان گفت که تیپ غالب *کلستریدیوم پرفرینجنس* موجود در منطقه‌ی اهواز، تیپ C و به مقدار کم‌تر تیپ D و در مراتب بعدی تیپ‌های A و B هستند که لازم است این یافته مد نظر سازندگان واکسن کشور قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه‌ی دکترای عمومی دامپزشکی انجام گردیده است و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت اعطای پژوهانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

حسنی‌طباطبایی، عبدالمحمد و فیروزی، رویا (۱۳۹۵). بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۱۴۳- ۱۱۴.

Ahsani, M.R.; Mohammadabadi, M.R. and Shamsaddini, M.B. (2010). *Clostridium perfringens* isolate typing by multiplex PCR. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 16(4): 573-578.

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. (2002). Short protocols in molecular biology. 5th ed, John Wiley and Sons, New York, Pp: 1-15.

Archive of SID

www.SID.ir

De la Rosa, C.; Hogue, D.E. and Thonney, M.L. (1997). Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. Journal of Animal Science, 75 (9): 2328-2334.

Deligaris, N.M. (1978). Study of enterotoxaemia of small ruminants (sheep and goat). Types of *Clostridium perfringens* responsible for the disease in Greece. Hellenic Veterinary Medicine, 21: 74-76.

Easamon, C.F.S. (1998). Principles of bacteriology virology and immunity. Vol 2: systematic bacteriology, Chapter 32: Clostridium: the spore-bearing anaerobes, Hatheway, CL. and Johnson, EA. Edward Aruold, 732-785.

Engstrom, B.E.; Fermer, C.; Lindberg, A.; Saarinen, E.; Baverud, V. and Gunnarsson, A. (2003). Molecular typing of isolates *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. Veterinary Microbiology, 94: 225-235.

Forbes, B.A. and Sahm, D.F. (2007). Baily & Scott'S Diagnostic Microbiology, 12th ed. Mosby,St. Louis, Mo., Pp: 511-519.

Gkiourtzidis, K.; Frey, J.; Bourtzi-Hatzopoulou, E.; Iliadis, N. and Sarris, K. (2001). PCR detection and prevalence of α-, β-, β2, ε-, ι- and enterotoxin genes in Clostridium pefringens isolated from lambs with clostridial dysen- tery. Veterinary Microbiology, 82 (1): 39-43.

Gokce, H.I.; Genc, O.; Sozmen, M. and Gokce, G. (2007). Determination of *Clostridium perfringens* Toxin-Types in Sheep with Suspected Enterotoxemia in Kars Province, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31(5):355-360.

Grevelding, C.G.; Kampkotter, A.; Hollmann, M.; Schafer, U. and Kunz, W. (1996). Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation. Nucleic Acids Research, 24(20): 4100-4101.

Hadimli, H.H.; Erganis, O.; Sayin, Z. and Aras, Z. (2012). Toxinotyping of *Clostridium perfringens* isolates by ELISA and PCR from lambs suspected of enterotoxemia. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 36(4): 409-415.

Heikinheimo, A. and Korkeala, H. (2005). Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. Letters in Applied Microbiology, 40: 407-411.

Itodo, A.E.; Adesiyun, A.A.; Odekeye, O.J. and Umoh, J.U. (1986). Toxin types of *Clostridium perfringens* strains isolated from sheep, cattle and paddock soils in Nigeria. Veterinary Microbiology, 12: 93-96.

Kalender, H.; Ertas, H.B.; Cetinkaya, B.; Muz, A.; Arslan, N. and Kilic, A. (2005). Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. Veterinary Medicine - Czech, 50(10): 439-442.

Kanakaraj, R.; Haris, D.L.; Songer, V.G. and Bosworth, B. (1998). Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. Veterinary Microbiology, 63 (1): 29-38.

Kurtkaya, M. and Alver, H. (1969). A study of distribution of the types of Enteroxemia in Turkey. Pendik Veteriner Kontrol Araştirma Enstitusu Dergisi, 2: 60-67. Abst.

Markey, B.K. et al. (2013). Clinical Veterinary Microbiology. 2nd ed. China, Mosby Elsevier, Pp: 215-238.

Mc Orist, A.L.; Jackson, M. and Bird, A.R. (2002). A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. Journal of Microbiological Methods, 50 (2): 131-139.

Michaud, V.; Gil, P.; Kwiatek, O.; Prome, S.; Dixon, L.; Romero, L. et al. (2007). Long-term storage at tropical temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of RNA and DNA viruses by direct PCR. Journal of Virological Methods, 146: 257-265.

Moussa, M.I. and Hessan, A.M. (2011). Molecular typing of *Clostridium perfringens* toxins recovered from Central Saudi Arabia. Saudi Medical Journal, 32(7): 669-674.

Ozcan, C. and Gurçay, M. (2000). Enterotoxaemia incidence in small ruminants in Elazig and the surrounding provinces in 1994-1998. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 24: 283-286.

Popoff, M.R. (1984). Bacteriological examination in enterotoxaemia of sheep and lamb. Veterinary Record, Pp: 114, 324.

Quinn, P.I.; Carter, M.E.; Markey, B. and Carter, G.R. (2013). Clinical Veterinary Microbiology, Vol 1, 2nd ed, Mosbey, Pp: 191-208.

Timoney, J.F.; Gillespie, J.H.; Scott, F.W. and Barlough, J.E. (1988). Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals, 8th ed, Comstock Publishing Associates, Ithaca, N.Y. USA, Pp: 214-240.

Archive of SID

www.SID.ir

Tschirdewahn, B.; Notermans, S.; Wernars, K. and Untermann, F. (1991). The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. International Journal of Food Microbiology, 14: 175-178.

Uzal, F.A. and Songer, J.G. (2008). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. Journal Veterinary Diagnostic Investigation, 20: 253-265.

Uzal, F.A.; Vidal, J.E.; McClane, B.A. and Gurjar, A.A. (2010). *Clostridium Perfringens* toxins involved in mammalian veterinary diseases. The Open Toxinology Journal, 2: 24-42.

Wen Qiyi, McClane Bruce, A. (2004). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods." Applied and environmental microbiology 70 (5): 2685-91.

Archive of SID

www.SID.ir

Typing of *Clostridium perfringens* isolates from sheep in Ahvaz

Gharibi, D.[1]; Ghorbanpour, M.[2]; Haji Hajikolaei, M.R.[3] and Mahmoudi Kohi, Z.[4]

Received: 08.05.2016 Accepted: 19.12.2016

Abstract

Clostridium perfringens is an important pathogen which causes numerous different diseases in animals. This bacterium is classified into five different types; A, B, C, D and E. *Clostridium perfringens* type D cause enterotoxemia in animals. The aim of this study was to identify different types of *Clostridium perfringens* in sheep in Ahvaz. For this purpose, 369 fecal samples were randomly collected from the sheep from a different area. After processing and culturing samples in blood agar containing neomycin, *Clostridium perfringens* suspected isolates were identified morphologically and biochemically. According to biochemical tests, from 369 feces samples, 56 isolates obtained and identified as C*lostridium perfringens*. For molecular confirmation of the isolate, the DNA of the isolates was extracted and the isolates were verified as *Clostridium perfringens* by PCR using specific primers for alfa toxin. The results showed that 54 isolated from 56 isolated confirmed as *Clostridium perfringens*. Typing of these isolates was done by PCR using specific primers for 5 different exotoxins of this bacterium. The results showed that 10 isolates (18/51%) were type A and 4 (7/4%), 24 (44/44%) and 16 isolates (29/62%) were type B, type C and type D respectively. Thus the most prevalent types of *Clostridium perfringens* were type C and D. In the present study, all isolates were negative for iota toxin and enterotoxin gene.

Key words: *Clostridium perfringens,* Genotype, PCR, Sheep, Ahvaz

Archive of SID

1- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- DVM Graduated from faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Gharibi, D., E-mail: d.gharibi@scu.ac.ir

www.SID.ir