Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال شانزدهم، پاییز، شماره ۳، ۱۳۹۸، ۲۹۱۰-۲۹۰۱

شناسایی مولکولی وارزیابی دز کشنده جدایه های سم زایی کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C موجود در گنجینه میکروبی موسسه رازی

لیدا عبدالمحمدی خیاو[1*] ، علیرضا پردیس[1]، علی حق روستا[1]

چکیده

کلستریدیوم پرفرینجنز عامل بیماری های متعدد از جمله انتروتوکسمی یا پرخوری یا قلوه نرمی می باشد . این بیماری با تغییر رژیم غذایی، تکثیر باکتری و تولید مقادیر زیاد توکسین بروز می نماید. بنابراین تشخیص توکسین در محتویات روده جهت تشخیص این بیماری استفاده می شود. به منظور پیشگیری از انتروتوکسمی واکسیناسیون به موقع ضروری می باشد. هدف از این مطالعه انتخاب توکسیژنیک ترین جدایه توکسیژنیک کلستریدیوم پرفرینجنزتیپ C به منظور استفاده در تولید واکسن می باشد. در این تحقیق، ۲۱ جدایه تیپ C مورد آزمایشات میکروبیولوژی و بیوشیمیایی قرار گرفته، سپس نمونه هایی که به روش روتین باکتریولوژیک تعیین هویت گردیدند، توسط آزمون PCR تأیید شدند. نهایتا توکسیژنیک ترین جدایه به وسیله MLD انتخاب گشته و واکسن آناکالچر تتراوالان انتروتوکسمی از نمونه سویه واکسینال و این جدایه تهیه گردید . واکسن آزمایشی برای ٤٥ روز سردخانه گذاری شده سپس آزمون پتنسی بر روی نمونه ها انجام پذیرفت . نتایج این بررسی نشان داد که میزان آنتی توکسین بتا جدایه موسسه رازی چهار برابر ضعیف تر از نمونه واکسن تهیه شده از سوش واکسینال می باشد.

واژگان کلیدی: کلستریدیوم پرفرینجنز، PCR، MLD، Potency ، واکسن آناکالچر تتراوالان

تاریخ دریافت:۱۳۹۸/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۸

مقدمه

کلستریدیوم پرفرینجنز Clostridium perfringens عامل بیماری های مختلف در دام شامل انتروتوکسمی، قلوه نرمی،اسهال عفونی بره های نوزاد،استراک و آنتریت هموراژیک می باشد. همچنین در انسان مسمومیت غذایی pigbel و گاز گانگرن را ایجاد می نماید (١٤). این باکتری توکسین های متنوعی را تولید می نماید. یکی از توکسین های مهم بتا توکسین می باشد (١٧).

۱بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران
(mohammadimail1396@gmail.com)

توالی نوکلئوتیدی توکسین بتا سویه NCTC۸۵۳ در سال ۱۹۹۳ مشخص گردید (ژن *cpb*) . این توکسین که در *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های B و C ایجاد بیماری می نماید بر روی پلاسمیدهایی با وزن ٦٥ تا ۱۱۰ کیلو باز قرار دارد (۱۸) ژن *cpb* پروتوکسین ۳۳٦ آمینو اسیدی را کد کرده که دارای سیگنال پپتید ۲۷اسید آمینه ای بوده که در حین خروج از سلول حذف شده و نهایتا یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۵ کیلو دالتون ایجاد می شود. مکانیسم عملکرد این توکسین با اتصال به پروتئینهای متصل به گانگلیوزیدها بوده که ایجاد منفذ میکنند و با ایجاد کانال باعث تورم و لیز سلول می شود (۲۰).

در ایران اولین مورد جداسازی *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C از انتریت نکروتیک در بچه خوک در سال ۱۹۷۱ گزارش شد که عامل مرگ و میر شدید۹۰۰ تا از ۱۳۰۰ بچه خوک در حین اپیدمی بود (۵). جداسازی و تشخیص *کلستریدیوم* های پاتوژنیک از حیوانات بیمار در سال ۱۹۸۸ نیز انجام گرفت. نتایج نشان داد از ۲۲۱ نمونه ۲۲ سویه *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B و ۱۸ سویه *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C جداسازی گردیدند (۲). در سال ۱۹۹۷ نیز ، هفده سویه *کلستریدیوم پرفرینجنز* پس از مرگ گوسفند و بز جدا گردیده و با استفاده از تست های بیوشیمیایی و آنزیم ایمونواسی مورد بررسی قرار گرفتند (EIA) که هفت مورد از این جدایه ها متعلق به *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B بودند (۱۰). در این مطالعه جدایه های آرشیو ایرانی

www.SID.ir

Archive of SID

کلستریدیوم پرفرینجنزتیپ C بخش بی هوازی موسسه رازی از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی همولیتیک توکسیسیتی بررسی و سپس مقایسه پتنسی مناسب ترین جدایه توکسیژنیک با سویه واکسینال (CN۳۰۱) انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

جدایه‌های باکتریایی : از ۲۱ سویه تیپ C و ۱ سویه واکسینال *کلستریدیوم پرفرینجنزتیپ* C برای بررسی استفاده گردید. آزمون‌های تاییدی جدایه ها: دراین مطالعه به منظور تائید از تست تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، مانیتول، ساکارز ، سالیسین و لاکتوز و تست های ژلاتیناز، لیسیتیناز، اندل، تخمیر طوفانی شیر، خصوصیت همولیتیک بر روی خون گوسفند، موتیلیتی و تست کاتالاز استفاده گردید.سپس آزمون PCR به منظور تایید تیپ *کلستریدیوم پرفرینجنز* با استفاده از پرایمر طراحی شده از قسمتی از توکسین بر روی جدایه ها انجام پذیرفت .

تخلیص DNA

نمونه‌ها در محیط کشت عصاره جگر تلقیح و در شرایط بیهوازی انکوبه گردید. سپس پاساژ آن در همین محیط کشت انجام و پس از رشد باکتری نمونه در دور rpm ٤٠٠٠ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی تخلیه و رسوب آن با ۸۰۰ میکرولیتر آب مخلوط گشته و مجددا سانتریفوژ بمدت ۵ دقیقه انجام گردید سپس مایع رویی تخلیه به رسوب ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE 1x اضافه گردید.این سوسپانسیون در دور rpm ٤٥٠٠ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مجددا مرحله قبل تکرار گردید. سپس ۵۰ میکرولیترلیزوزیم اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۵ میکرولیتر RNase A به نمونه اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون ۸ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید. پس از ٦۰ دقیقه انکوباسیون مخلوط فنل کلروفرم اضافه و سانتریفوژ گردید. مایع رویی را برداشته و مجددا همین مرحله تکرار گردید سپس به فاز رویی ایزوپروپانل سرد اضافه نموده و نمونه در فریزر به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm به رسوب حاصله ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۵٪ اضافه و سپس در دور ۱۵۰۰۰rpmبه مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مجددا مرحله قبلی تکرار شده سپس مایع روئی تخلیه گردید و در ٤٥ درجه به مدت ٦۰ دقیقه قرار گرفت. در نهایت ۳۰ میکرولیتر آب به آن اضافه گردید.

آزمون PCR برای تعیین هویت توکسین آلفا

برای PCR، ۱ میکرولیتر DNA template ، بافر ۱X PCR ، dNTP ۱۵۰µM، $Mgcl_2$ ۱/۵ Mm، ۲ U DNATaq پلی مراز ، ۱ میکرولیتر پرایمر F (۱۰ پیکو مول) ، ۱ میکرولیتر پرایمر R (۱۰ پیکو مول) ، و آب اضافه نموده تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برسد. . پرایمرهای PCR در جدول ۱ آورده شده است.(۱۹و٦) در کنترل منفی DNA ژنومیک بجای DNA template آب ریخته سپس نمونه را در دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) گذاشته تا PCR انجام شود . برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۱ دقیقه ای در ۹۵ درجه، ۱ دقیقه در ۵۳ درجه سانتی گراد ۱/۳۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و متعاقب آن پلی مریزیشن برای ۱۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. سپس محصول PCR را با لودینگ بافر (Loading buffer) مخلوط و درون چاهک های ژل آگاروز ۱٪ ریخته و پس از الکتروفورز با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) رنگ آمیزی

www.SID.ir

Archive of SID

نمـوده در نهایـت توسـط دسـتگاه ژل داک (Gel Doc) عکس برداری شد.

آزمون PCR برای تعیین هویت توکسین بتا

بـرای PCR، ۱ میکرولیتـر DNA template ، بـافر ۱X PCR ، ۱/۵ Mm، µ۱۵۰M dNTP ، $Mgcl_2$ ۲ U ، DNATaqپلـی مـراز ، ۱ میکرولیتـر پرایمـر F (۱۰ پیکـو مـول) ، ۱ میکرولیتـر پرایمـر R (۱۰ پیکـو مـول) ، و آب اضـافه نمـوده تـا بـه حجـم نهـایی ۲۵ میکرولیتـر برسـد. در کنتـرل منفـی DNA ژنومیـک بجـای DNA template آب ریختـه سـپس نمونـه را در دسـتگاه ترموسـایکلر گذاشـته تـا PCR انجـام شـود . همچنین بـه عنـوان کنتـرل از *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیـپ D (CN٤٠٩) بـرای توکسـین اپسـیلون اسـتفاده گردیـد (کنتـرل منفـی). برنامـه PCR شـامل دناتوراسـیون اولیـه در ۹۵ درجـه سـانتی گـراد بـرای ۵ دقیقـه، ۳۵ سـیکل ۱ دقیقـه ای در ۹۵ درجـه، ۱ دقیقـه در ۵۲ درجـه سـانتی گـراد ۱/۳۰ دقیقـه در ۷۲ درجـه سـانتی گـراد و متعاقـب آن پلـی مریزیشـن بـرای ۱۰ دقیقـه مـی باشـد. سـپس محصـول PCR را درون چاهـک هـای ژل آگـاروز ۱٪ ریختـه و پـس از الکتروفـورز بـا اتیـدیوم بروماید در نهایـت توسـط دسـتگاه ژل داک عکـس بـرداری شـد. پـس از تاییـد مناسـبترین محـیط کشـت جهـت فعالیـت توکسیسیتی انتخاب گردید.

انتخاب مناسبترین محیط کشت جهت فعالیت توکسیسیتی : در این مطالعه ٤ محیط کشت به صورت زیـر تهیـه گردیـد. محـیط کشـت اول TYG (حـاوی soy Tryptic broth ۳٪، گلـوکز۲٪ ، عصـاره مخمـر۱٪ و سیسـتیین۱٪)، محـیط کشـت دوم TPYG (حـاوی پپتـون گوشـت ۵٪ ، پپتـون پرتئوز۰/۵٪ ، عصاره مخمر ۰/۵٪ ،گلوکز ۰/۵٪ ، سدیم تـایو گلیکولات ۰/۱٪ و سیسـتیین ۰/۰۵٪) ،محـیط کشـت سـوم (حـاوی پپتـون۳٪ ، نمـک ۰/۲۵٪ ، دی سـدیم فسـفات۱٪ ،گلوکز۱٪ ، تریس ویتامین ۰/۷۵٪) و محـیط کشـت چهـارم (حـاوی پپتـون گوشـت ۳٪ ،پپتـون پرتئـوز۲٪ ، عصـاره مخمر۱٪، گلوکز۱٪ ، پـودر جگـر۰/۷۵٪ ، سیسـتیین ۰/۱٪ ، گوشت قطعه قطعه شده ۱۰٪ ، تریس ویتامین ۰/۷۵٪ ، نمک ۰/۲۵٪ و دی سـدیم فسـفات ۱٪). پـس از تنظـیم pH در داخل لوله ها تقسـیم و در ۱۲۱ درجـه سـانتیگراد بـرای ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد . پس از کشت سویه واکسینال در ٤ محیط فوق الذکر ، تست MLD به منظور مقایسه توکسـین زایـی مناسبترین محیط کشت و زمان انجـام گردیـد. نهایتـا محـیط کشت جهارم و زمان ۵ ساعت جهـت انجـام تسـت MLD انتخاب گردید.

کشت : نمونه های مشکوک را داخل لوله جگر تلقیح نمـوده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شـرایط بی هوازی انکوبه کـرده ، بـه عنـوان کنتـرل منفـی از محـیط کشت تریپتیکیز سوی براس در شرایط هـوازی و بـه عنـوان کنترل مثبت از سویه واکسن *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیـپ C استفاده گردید. پـس از ٢٤ سـاعت سوسپانسـیون در محـیط کشت تلقیح و در شـرایط بـی هـوازی بـه مـدت ۵ سـاعت انکوبه گردید سپس تست MLD بر روی نمونـه هـا انجـام گردید. تست حداقل دز کشندگی (MLD) : دو میلـی لیتـر ازهر نمونه را در دور ٤۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمـای ۲۵ درجه سانتی گـراد سـانتریفوژ نمـوده سـپس از سـوپرناتانت رقتهای مختلف را تهیه نموده (برای تیـپ C از رقـت ۱/۱۰ الی ۱/۳۰۰۰) و ۰/۵ میلی لیتـر از هـر رقـت بـه دو مـوش N.M.R.I ۱۷-۲۲ گرمی به صورت داخـل وریـدی تزریـق گردید . آخرین رقتی مرگ و میـر بـه عنـوان نتیجـه تسـت حـداقل دز کشـندگی گـزارش گردیـد. پـس از انتخـاب توکسیژنیک ترین جدایه آرشیو، از مناسـب تـرین جدایـه و همچنین یک سویه واکسینال، دو واکسن آناکالچر آزمایشی با نسبتهای *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیـپ D ٦۰٪ ، *کلسـتریدیوم*

www.SID.ir

Archive of SID

پرفرینجنز تیپ B ٪۱۰ ، *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C ٪۱۵ ، *کلستریدیوم سپتیکوم* ۱۵٪ تهیه نموده ، پس از افزودن فرمالدئید (۰٪٦) تست های فیزیکوشیمی (اندازه گیری pH و فرمالدئید) ، آزمون میکروبیولوژی ، بی ضرری و Residual toxicity انجام گردید.

آزمون میکروبیولوژی : دو نمونه واکسن در محیط کشت تایوگلیکولات مایع ، TSB و بلاد آگار کشت و در شرایط هوازی انکوبه شدند. بلاد آگار به مدت ۷۲ ساعت و تایوگلیکولات مایع و TSB به مدت ١٤ روز بررسی و نتایج کشت گزارش گردید (۹).

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

ژن توکسین	پرایمرها	توالی ('5-'3)	آمپلیکون	منابع
Cpa	CPA5L	AGTCTACGCTTGGGATGGAA	۹۰۰	(۶)
	CPA5R	TTTCCTGGGTTGTCCATTTC		
Cpb	CPBL	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA	٦١١	(۶)
	CPBR	TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA		
Etx	ETXII-F	5-TAC TCA TAC TGT GGGAAC TTC GAT ACA AGC-3	٤٠٢	(۱۹)
	ETXII-R	°CTCATCTCCCATAACTGCACTATAATT TCC-3		

تست بی ضرری : دو نمونه واکسن به صورت زیر جلدی به دو راس گوسفند ٤٠ کیلوگرمی به میزان ۵ و۱۰ میلی لیتر در ناحیه بالای کتف تزریق وگوسفندان به مدت ١٤ روزتحت نظرقرار گرفتند (۹).

Residual toxicity: دو نمونه واکسن به صورت زیر جلدی به ۵ موش NIH به میزان ۰/۵ میلی لیتر در ناحیه پا تزریق و موش ها به مدت ۷ روز تحت نظرقرار گرفتند(۹). پس از ٤۵ روز سردخانه گذاری تست پتنسی (سرم نوترالیزاسیون) در مقایسه با سویه واکسینال انجام گردید. برای این ۳ میلی لیتر نمونه دو واکسن به ۱۲ خرگوش ۳ کیلوگرمی به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت گردن تزریق گردید. پس از ۲۸ روز تزریق یادآور و ١٤ روز بعد از تزریق دوم خونگیری از قلب خرگوش ها انجام گردید . سپس جدا سازی سرم و مراحل اندازه گیری میزان آنتی توکسین بتا به ترتیب زیر انجام گردید .

۱. آماده سازی محلول توکسین: ۱۰ میلی گرم توکسین بتا تخلیص شده در ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی یا PBS حل گردید به این صورت محلول mg/ml ۱ حاصل گردید.

۲. آماده سازی آنتی توکسین استاندارد : آنتی توکسین استاندارد با مخلوط گلیسرول و سرم فیزیولوژی مخلوط سپس توسط بافر سرم فیزیولوژی رقیق گردید بطوریکه محلول IU/ml ۲/۵ تهیه گردید.

۳. آماده سازی آنتی سرم خرگوش واکسینال و آنتی سرم فیلدی : از سرم خرگوش های واکسینه رقت ۱/۲ تهیه گردید.

٤. آماده سازی محلولها برای تزریق : نسبتهای ۰/۱ ،۰/۰۵/۳، ۰/۷، ۰/۹ ازآنتی توکسین استاندارد با ۱ میلی لیتر ازتوکسین

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط و توسط سرم فیزیولوژی به حجم ۲ میلی لیتر رسانده شد. همین عمل برای آنتی سرم فیلدی و آنتی سرم واکسینال انجام گردید . پس از مخلوط نمودن محتویات لوله ها ، به مدت ٤٥ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید تا نوترالیزاسیون بین توکسین و آنتی سرم انجام شود.

سپس ۰/۵ میلی لیتر از هررقت به دو موش N.M.R.I -۲۲ ۱۷ گرمی به صورت داخل وریدی به ناحیه دم تزریق گردید .در نهایت میزان آنتی توکسین با مقایسه آنتی توکسین استاندارد و آنتی سرم واکسینال یا آنتی سرم فیلدی بر حسب واحد بین الملل محاسبه گردید (۹) .

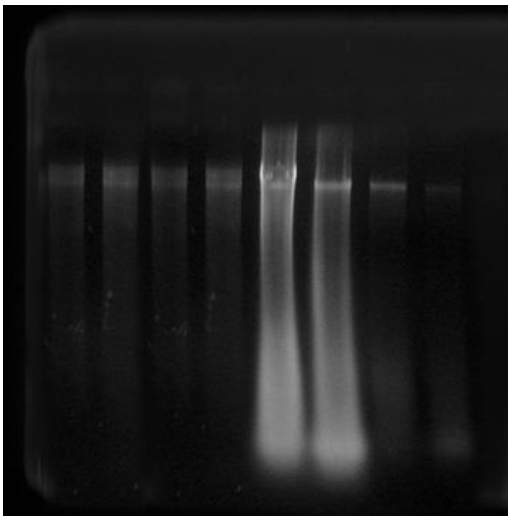
نتایج

جدایه ها 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 قادر به تخمیر طوفانی بودند ولی اندل، حرکت و کاتالاز منفی بودند. تمامی جدایه ها همولیز بتا ایجاد نموده و دراسلاید رنگ آمیزی گرم باسیل گرم مثبت مشاهده شد.

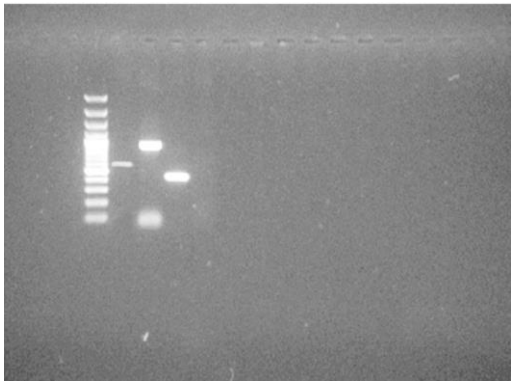
نتایج تخلیص DNA ژنومی در نگاره ۱ نشان داده شد. توکسین اپسیلون در ٤۰۰ کیلو باز ، توکسین آلفا در ۹۰۰ کیلو باز و توکسین بتا در ٦۱۱ کیلو باز و در کنترل منفی باندی مشاهده نشد . نتیجه PCR در نگاره ۲ نشان داده شد.

با توجه به نتایج MLD سویه فیلدی C۳۱٤ بالاترین میزان توکسین زایی را داشت (جدول ۲). آزمون میکروبیولوژی دو واکسن نشان داد که آلودگی به سایر باکتریها و قارچها ندارند و همگی باکتری را به صورت خالص دارند.

نتایج بی ضرری و Residual toxicity واکسن عارضه ای را



نگاره ۱. استخراج DNA سویه واکسن کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C و نمونه های مشکوک



نگاره ۲. اولین چاهک مربوط به ladder، دومین چاهک توکسین بتا ٦۱۱ جفت باز، سومین چاهک توکسین آلفا ۹۰۰ جفت باز، چهارمین توکسین اپسیلون ٤۰۲ جفت باز، پنجمین کنترل منفی

در گوسفندان و موش ها ایجاد ننمود و واکسن تهیه شده بی ضرر و Safe می‌باشد .نتایج سرم نوترالیزاسیون نشان داد که در رقت ۰/۳ آنتی توکسین استاندارد بتا دو موش (رقت ۰/٤) و در رقت ۰/۵ آنتی سرم دو موش (رقت ۰/٦) مردند. لذا مقدار آنتی سرم واکسینال ۲۰ واحد بین الملل و آنتی سرم فیلدی ۵ واحد بین الملل در میلی لیتر بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. MLD سویه های آرشیو و واکسینال *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C

رقت سویه	۱/۱۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰۰۰	۱۵۰۰/۱	۲۰۰۰/۱	۲۵۰۰/۱	۳۰۰۰/۱	نتیجه	میزان توکسین	سویه
۳۲٤	++	++	++					۲۵۰۰/۱	ng۹۷۵	آفریقای جنوبی
۳۲۵	++	++	+					۱/۱۰۰۰	ng۷۸۰	انستیتوپاستور
۳۲۰	++	++						۵۰۰/۱	ng۳۹۰	تبریز
۳۲۱	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	انگلستان
۳۰۱	++	++						۱۵۰۰/۱	ng۱۱۷۰	انستیتو فایزر
۳۰٤	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	قزوین
۳۲۷	++	++	++	+	+			۱۷۵۰/۱	ng۱۳٦۵	شرق آذربایجان
۳۰۲	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	انگلستان
۳۳۳	++	++	+					۱/۱۰۰۰	ng۷۸۰	دانشکده دامپزشکی تهران
۳۱۸	++	++	++	+				۱۵۰۰/۱	ng۱۱۷۰	انگلستان
۳۱۲	++	++	++	+				۱۵۰۰/۱	ng۱۱۷۰	نامشخص
۳۱٤	++	++	++	++	+	+		**۲۲۵۰/۱**	**ng۱۷۵۵**	نامشخص
۳۱٦	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	موسسه رازی
۳۲٦	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	نامشخص
۲/۳۲۷	++	++	+					۱/۱۰۰۰	ng۷۸۰	نامشخص
۳۳۲	++	++	++					۱۲۵۰/۱	ng۹۷۵	نامشخص
۳/۳۲٤	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	نامشخص
۳۳۵	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	نامشخص
۳۳٦	++	++	++	+				۱۵۰۰/۱	ng۱۱۷۰	نامشخص
۳۳۷	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	نامشخص

www.SID.ir

Archive of SID

۳۲۳	++	++						۱/۵۰۰	ng۳۹۰	انگلستان
واکسینال	++	++	++	++	++	+	+	۲۷۵۰/۱	ng۲۱٤٥	واکسینال

نتایج این تست نشان داد که میزان آنتی توکسین بتا واکسن تهیه شده از جدایه آرشیو چهار برابر ضعیف تر از نمونه واکسن تهیه شده از سوش واکسینال می باشد.

بحث

کلستریدیوم ها عامل بیماری های متعددی در دام و انسان می باشند و با درگیر نمودن شدید دام ها خسارات سنگین اقتصادی را به صنعت دامپروری وارد می نمایند. *کلستریدیوم* ها به دلیل ایجاد اسپور از اهمیت خاصی برخوردار می باشند. زیرا اسپور شدیدا مقاوم به عوامل فیزیکی و شیمیایی بوده و می تواند از طریق گوارشی ویا تماس با زخم باز در انسان عامل بیماریزایی گردد . *کلستریدیوم پرفرنجنز* تیپ C که عامل بیماری های مختلفی در دام می باشد دارای فاکتورهای ویرولانس متعددی می باشد. توکسین بتا به عنوان مهمترین فاکتور پاتوژنیک توسط سویه های این باکتری شناسایی شده است. مکانیزم دقیق بیماریزایی این توکسین به طور کامل شناسایی نشده است. آزمون های متفاوتی برای تشخیص *کلستریدیوم* ها ذکر شده که از جمله آن ها می توان به آزمون های باکتریایی، بیوشیمیایی (هیرولیز لیسیتین، تخمیر قندها، تخمیر طوفانی شیر تورنسل و اندل اشاره نمود (١٤). همچنین از آزمون خنثی سازی در موش آزمایشگاهی برای تشخیص استفاده می گردید که البته در مورد بتا توکسین به دلیل حساسیت توکسین باعث نتایج منفی کاذب در مواردی می گردید (١١).امروزه بیشتر از تکنیک های اینویترو برای تشخیص توکسین های باکتری با روش های متنوع استفاده می نمایند (١٥). در سال ۲۰۰۲ Aschfalk و همکاران از آنزیم ایمونواسی (٤) و در سال ۲۰۰۷ Gokce و همکاران و در سال ۲۰۱۲ (١١) Hadimli و همکاران از الایزا برای تشخیص توکسین این باکتری استفاده نمودند (١٢). در سال ۲۰۰۸ Albini و همکاران PCR را به عنوان روشی قابل اطمینان برای تشخیص گزارش نمودند (١).

امروزه با توجه به مزایای تکنیک های مولکولی از جمله حساسیت، ویژگی، دقت و سرعت استفاده از آن ها برای تشخیص روز به روز در حال افزایش می باشد (٨ و ٧)

در مطالعه حاضر از تست های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی و PCR برای شناسایی *کلستریدیوم* ها استفاده شد .توکسین اپسیلون در ٤٠٠ کیلو باز ، توکسین آلفا در ۹۰۰ کیلو باز و توکسین بتا در ٦١١ کیلو باز و در کنترل منفی باندی دیده نشد . همین نتایج در مطالعه Songer و Meer نیز مشخص شد (١٩ و٦).

توزیع تیپ های *کلستریدیوم پرفرینجنز* در نقاط مختلف جغرافیایی متفاوت می باشد. در بعضی از مناطق جغرافیایی هم یک تیپ به عنوان تیپ غالب ذکر شده است. به عنوان مثال در آمریکای شمالی، بلژیک، کره، ترکیه، ایران، هند، نیجریه تیپ غالب A گزارش گردید (١٥ و١١ و ٣). ممکن است در بعضی از مناطق جغرافیایی یک تیپ وجود نداشته باشد. مثلا *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B در قاره آمریکای شمالی یافت نشده است. در حالیکه در انگلستان و آفریقای جنوبی عامل اسهال خونی در بره می باشد که ضرر و زیان سنگینی را به بار می آورد (١٣) در ایران *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B واریانت ایرانی وجود دارد (١٠) که در بعضی مناطق جغرافیایی مشاهده نمی شود.

www.SID.ir

Archive of SID

در ایران در زمینه MLD *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B و Potency به روش خنثی سازی در موش آزمایشگاهی مقاله ای چاپ نشد. بررسی در سال ۱۳۶۵ توسط اردهالی و همکاران در زمینه جداسازی *کلستریدیوم پرفرینجنز* از خاک مراتع کرج صورت گرفت. در آن بررسی هیچ مورد *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های B، C و E جداسازی نگردید. از سوی دیگر *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D ایزوله شده از حداقل دز کشندگی (MLD) پایینی نسبت به سویه های واکسینال برخوردار بود (۳). Nillo بررسی در زمینه MLD *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C انجام و گزارش نمود نتیجه آن محدوده وسیعی از رقت ۱/۵۰۰ تا ۱/۱۵۰۰ می باشد. البته در ادامه اشاره نمود که بعضی از جدایه ها ممکن است میزان پایینی از توکسین را ترشح نمایند (۱۶) در بررسی اردهالی بر روی *کلستریدیوم پرفرینجنز* ایزوله شده نیز این نتیجه مشاهده گردید (۳). در این بررسی محدوده MLD از رقت ۱/۵۰۰ تا ۱/۲۲۵۰ بود که با نتیجه Nillo مطابقت دارد. پتنسی سوش آرشیو ضعیف تر از سوش واکسینال بود. بنابراین سوش واکسینال مناسب تر از جدایه های آرشیو می باشد.

فهرست منابع

1. Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschlaeger, N., Frey, J., Miserez, R., Abril, C. (2008): Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of Clostridium perfringens toxin genes in animal isolates. Vet microbiol, 127: 179-185.
2- Ardehali, M., Moosawi, M., Avazpoor, J. (1988): Isolation, typing and rapid diagnosis of pathogenic clostridia from infected animals in Iran. Arch. Inst. Razi. 38, 39: 35-42.
12- Hadimli, H.H., Erganis, O., Sayin, Z., Aras. Z. (2012): Toxinotyping of Clostridium perfringens isolates by ELISA and PCR from lambs suspected of enterotoxemia. Turk. J. Vet. Anim Sci. 36(4): 409-415.
3- Ardehali, M., Moosawi, M., Pilehchian, R. (1994): Isolation of toxigenic strains of Clostridium perfringens from the soil of farms in Iran. Arch.Inst.Razi. 44,45: 95-100.
4- Aschfalk, A., Younan, M., Drochner, W., Müller, W. (2002): The distribution and frequency of Clostridium perfringens toxinotypes in healthy sheep in Benin, West Africa. Tropical animal health and production. 34: 289-293.
5- Baharsefat, M., Ardehali, M., Amjadi, AR., Ahourai, P., Darakhshan, H., Dowran, H. (1974): First report on infectious necrotic enteritis in piglets in Iran. Arch Inst Razi. 26:31–8.
6- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe R. (2004): Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of Clostridium perfringens isolates. Vet Microbiol. 100: 11-16.
7- Deprez, P. (2015): Clostridium perfringens infections–a diagnostic challenge. Veterinary Record, 177: 388-389.
8- Elsify, A., Tarabess, R., Nayel, M., Salama, A., Allaam, M., Hassan, H. , Zaghawa, A., Elballal, S. (2016): Bacteriological and molecular studies on Clostridium perfringens isolated from sheep in three Egyptian provinces. African Journal of Microbiology Research, 10: 725-732.
9- European Pharmacopoeia. Clostridium perfringens Vaccines for Veterinary use. (2017). 363. 7. Huang, X., Wang, Y., Xing, Z., Du, K. (2016): Emission factors of air pollutants from CNG-gasoline bi-fuel vehicles: Part II. CO, HC and NOx. Sci. Total Environ. 565:698-705.
10- Ghazi, F., Younan, M., Ardehalli, M., Muller, W. (1997): Differentiation of proteinase (minor toxin lambda) in Clostridium perfringens strains from sheep and goats in Iran. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 104(10):443–5. [PubMed: 9394541].
11- Gokce, H.I., Genc, O., Sozmen, M., Gokce, G. (2007): Determination of Clostridium perfringens toxin-types in sheep with suspected enterotoxemia in Kars province, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. 31(5): 355-360.

www.SID.ir

Archive of SID

13- Jansen, B.C. (1961): The beta toxin of Clostridium welchii type B, Wilsdon , in relation to the production of a vaccine against lamb dysentery. Onderstepoort. J.Vet.Res.28: 495-549.
14- Mac Faddin, J.F. (2000): Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, Lippincott Williams& Wilkins, Baltimore.
15- Mainil, J. (2006): Genus Clostridium-Clostridia in medical, veterinary and food microbiology: Diagnosis and typing. Control of infectious diseases, European Communities, Printed in Luxembourg.
16- Nillo. L. (1963): Bovine enterotoxemia II. Experimental reproduction of the disease. The Canadian Veterinary Journal. 4: 288-298.
17- Sakurai, J., Nagahama, M. (2006): Clostridium perfringens beta-toxin: characterization and action. Toxin Rev. 25: 89–108.
18- Sayeed, S., Li, J., McClane B.A. (2010): Characterization of virulence plasmid diversity among Clostridium perfringens type B isolates. Infect immune. 78(1): 495-504.
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- Vidal, J.E., McClane, B.A., Saputo, J., Parker, J., Uzal, F. A. (2008): Effects of Clostridium perfringens beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. Infect. Immun. 76: 4396–4404.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir