Archive of SID

شماره ۸۳، تابستان ۱۳۸۸

نشریه دامپزشکی

(پژوهش و سازندگی)

شناسایی سریع *Clostridium perfringens* تایپ‌های A‘ B‘C‘ D به روش Multiplex PCR

• **مجتبی سعادتی** (نویسنده مسئول)، • **مهدی کمالی**، • **محمدباقر صالحی** و • **محمود تولایی**

دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)- مرکزتحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست

• **غلامرضا اولاد**،

گروه علوم زیستی، دانشگاه امام حسین(ع)

• **پیله چیان** و • **محسن موسوی شوشتری**

مؤسسه سرم و واکسن سازی رازی کرج

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۷

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۵۹۱۸۳۴

Email: saadati-M@yahoo.com

چکیده

Clostridium perfringens **بخشی از فلور طبیعی خاک می‌باشد و گزارشات متعددی از جدا شدن این ارگانیسم از مواد غذایی خام و پخته وجود دارد. این باکتری به پنج تایپ A تا E تقسیم شده است و این تقسیم بندی بر اساس تولید سم آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا می‌باشد. در این مطالعه از واکنش multiplex PCR جهت شناسایی باکتری *Cl. perfringens* تایپ‌های A, B,C, D استفاده شد. تائید اولیه تیپ‌های باکتریایی مورد استفاده با روش بیوشیمیایی و سرولوژیکی صورت گرفت. جهت شناسایی بوسیله PCR، چهار جفت پرایمر با دمای ذوب نزدیک به هم طراحی گردید. قطعات تکثیر یافته برای تیپ A، ۱۱۶۷ جفت باز (سم آلفا) و برای تیپ B، ۱۱۶۷ و ۱۰۲۵ و ۹۶۱ جفت باز (سم آلفا، سم بتا و سم اپسیلون) و برای تیپ C، ۱۱۶۷ و ۱۰۲۵ جفت باز (سم آلفا و سم بتا) و برای تیپ D، ۱۱۶۷ و ۹۶۱ جفت باز (سم آلفا و سم اپسیلون) بود. جهت بررسی ویژگی واکنش از باکتری *Cl. botulinum* به عنوان کنترل منفی استفاده شد که نتایج PCR آن با پرایمرهای طراحی شده منفی بود. نتایج این تحقیق نشان داد که شناسایی کلستریدیوم پرفرنجنس با استفاده از multiplex PCR بسیار ساده، حساس، اختصاصی و در حداقل زمان بوده و می‌توان جهت تعیین تایپ‌های *Cl. perfringens* A, B,C, D استفاده نمود.**

کلمات کلیدی: Multiplex PCR، *Clostridium perfringens* و ژنوتایپ

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 83 pp: 63-71

Fast detection of *Clostridium perfringens* Type A,B,C and D by Multiplex PCR

By: Saadati M, Olad G, Biology Department, Basic Science Research Center, Imam Houssein University, Kamali M. Salehi M. B. Tavalaei, M. Applied Biotechnology and Environmental Research Center, Baqiyatallah Medical Science University, Pilechian, and Musavi M. Department of Anaerobiology, Razi Serum and Vaccine Institute, Karaj.

Clostridium perfringens is a part of the microflora of soil, and many reports have revealed the widespread occurrence of this organism in raw and processed foods. *C. perfringens* is classified into five types (types A to E), depending upon their ability to express alpha, beta, epsilon, and iota toxins In this study, a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay was developed for detection of *C. perfringens* types A, B, C and D. These strains have formerly been confirmed by the biochemical methods as well as serological test. For detection by PCR, four primer pairs with equal melting temperatures, were designed. DNA amplification fragments of 1167 bp for *C. perfringens* type A alone (α toxin), 1167 bp, 1025 bp and 961 bp for *C. perfringens* type B (α, β and ε toxin) 1167 bp and 1025 bp for *C. perfringens* type C (α and β toxin), and 1167 bp and 961 bp for *C. perfringens* type D (α and ε toxin) were obtained. *Clostridium botulinum* ued as negative control and did not yield a PCR product. These findings suggest that the assay is easy, timesaving, sensitive and specific and can use for detection of A, B, C and D types of *C. perfringens*.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Multiplex PCR, Genotype

مقدمه

باکتری *Clostridium perfringens* یکی از عوامل مهم هیستوتوکسیک و ایجادکننده بیماری دستگاه گوارش در انسان و حیوانات می‌باشد.(۱، ۲ ، ۲۳) این باکتری قادر است سموم مختلفی را تولید نماید (۶) و بر اساس تولید سموم اصلی که عبارتند از آلفا(α)، بتا (β)، اپسیلون(ε) و یوتا(ι)می‌باشند به ۵ تایپ A تا E طبقه‌بندی شده‌اند(۵). تایپ A منحصراً تولید سم آلفا می‌نماید این در حالی است که تایپB, تولید سم آلفا، بتا و اپسیلون، تایپ C تولید سم آلفا و بتا، تایپ D تولید سم آلفا و اپسیلون و تایپ E تولید سم آلفا و یوتا می‌نماید (۱۴). سموم تولید شده توسط تایپ‌های مختلف می‌توانند در بیماران علائم مختلفی را نشان دهند(۱۳). بعضی از سویه‌های این باکتری تولید سم دیگری به نام انتروتوکسین می‌نمایند که باعث اسهال در انسان و حیوانات اهلی می‌شود ولی به جهت عمومیت تولید آن در تمام تایپ‌ها، فاقد ارزش افتراقی بین آنها می‌باشد(۲۶ ، ۳۱).

تاکنون روش‌های مختلفی جهت شناسایی باکتری *Clostridium perfringens* از جمله تست‌های ایمونولوژیکی مثل تست خنثی‌سازی (نوترالیزاسیون) در حیوانات آزمایشگاهی (۲۵) و تست الیزا (۱، ۱۵، ۱۷ ، ۱۸) مورد استفاده قرار گرفته است که اساس این روش‌ها بر استفاده از آنتی سرم اختصاصی ضد سم‌های اصلی (آلفا، بتا، یوتا و اپسیلون) می‌باشد. روش‌های فوق علاوه بر زمان بر بودن، صرف هزینه فراوان، از ویژگی و اختصاصیت کمتری نسبت به روش‌هایی که اخیراً مطرح شده برخوردار است. در روش مولکولی، شناسایی باکتری مبتنی بر تعیین توالی ژن‌های مربوط به چهار سم اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا مورد استفاده می‌باشد. (۳، ۷، ۸، ۱۱، ۱۲، ۱۶، ۲۴). استفاده از این روش اختصاصی برای تشخیص سریع و درمان مناسب بیماری‌های روده‌ای کلستریدیال در حیوانات موفقیت‌آمیز بوده است (۲۶). در روش Multiplex PCR، در هر واکنش PCR از یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر کدام از ژن‌های cpa (ژن آلفا توکسین)؛ cpb (ژن بتا توکسین)، etx (ژن اپسیلون توکسین)، و iap (ژن یوتا توکسین) استفاده شده است (۱۲). این روش با توجه به مزایای آن می تواند روش مناسب و دقیقی برای جایگزین نمودن آن با دیگر روش‌ها جهت شناسایی بیماری‌های ناشی از باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در انسان و حیوانات باشد (۱۱، ۲۱، ۲۲، ۲۸)

مواد و روش‌ها

آنزیم Taq DNA polymerase و آنزیم‌های محدودگر و مارکر ۱۰۰ bp DNA ladder و موادی از قبیل Tris-base، EDTA، dNTP، $MgCl_2$، RNAse، کلر فرم، فنل، اسید بوریک، اتیدیوم بروماید و لیزوزیم از داخل کشور تهیه گردید. از پلاسمید pUC۱۸ برش داده شده با آنزیم TaqI و DNA ladder ۱۰۰جفت باز، بعنوان شاخص وزن (Marker) برای قطعات DNA در ژل الکتروفورزاستفاده گردید.

سویه باکتریایی

سویه *Cl. perfringens*، تایپ‌های A,B,C,D (به صورت ویال‌های لیوفلیزه) از موسسهء واکسن‌سازی رازی کرج تهیه گردید. این سویه‌ها از مناطق مختلف کشور تهیه شده و پس از شناسایی با روش بیوشیمیایی، نسبت به تعیین تایپ آن‌ها با استفاده از روش سرولوژیک اقدام گردید. سویه *Cl. botulinum* تایپ A مورد استفاده در این تحقیق از انستیتو پاستور ایران تهیه و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و تست خنثی سازی سم (Bioassay) مورد تائید قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه DNA الگو

پس از کشت باکتری در شرایط بی هوازی نسبت به استخراج DNA ژنومیک به روش لیز قلیایی اقدام گردید (۲۵). DNA ژنومیک بدست آمده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی، و پس از تعیین غلظت با روش ژل و اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای مراحل بعدی کار مورد استفاده قرار گرفت.

طراحی پرایمر

با توجه به ترادف ژن‌های *C. perfringens* cpa, cpb, etx, iap، پرایمرهای اختصاصی برای دو سر هر ژن طراحی گردید. قبل از سفارش ساخت، با استفاده از نرم افزارهای DNAsis،Oligo بررسی احتمال تشکیل لوپ و دایمر بین پرایمرها و با استفاده از نرم افزار Blast جهت بررسی همولوژی این پرایمرها با دیگر ژن‌ها ارزیابی‌های لازم انجام گردید.

شناسایی *C.perfringens* با روش PCR

جهت شناسایی بروش PCR، تهیه DNA ژنومیک *C. perfringens* و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای هر کدام از ژن‌های آلفا (cpa)، بتا (cpb)، اپسیلون (etx) و یوتا (iap) انجام گردید. سپس هر باکتری بر اساس حضور یا عدم حضور یک یا چند ژن فوق، بوسیله واکنش PCR و ارزیابی محصولات آن بر روی ژل الکتروفورز، شناسایی گردید.

واکنش PCR

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با ترکیبات زیر انجام گردید: ۱ میکرولیتر از DNA ژنومیک (در هر واکنش یک تایپ به صورت مجزا)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (۱۰U/µl)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۲۰ pmol/µl)، ۲ میکرولیتر از dNTPs (۲/۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۱/۵ میکرولیتر MgCl۲ (۵۰ میلی‌مولار). واکنش PCR در ۲۷ سیکل مطابق جدول ۲ انجام شد. جهت بررسی محصول PCR، ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگاروز ۱ درصد انتقال داده شد و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و مشاهده گردید(۱۹).

هضم آنزیمی محصول PCR

جهت تائید صحت محصولات PCR، واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم محدودگر مناسب(Hind III) برای هر سه ژن cpa, cpb, etx انجام گردید.

بررسی میزان اختصاصیت واکنش

به منظور بررسی واکنش متقاطع بین سویه‌های مختلف کلستریدیوم، PCR با استفاده از DNA ژنومیک *Cl. botulinum* با پرایمرهای اختصاصی *C. perfringens* انجام گردید. این واکنش بین تایپ‌های مختلف *C. perfringens* نیز مورد بررسی قرار گرفت.

جدول۱- ترادف پرایمرهای طراحی شده برای تعیین تایپ کلستریدیوم پرفرنجنس بروش Genotyping (PCR)

طول قطعه ژن	ترادف پرایمر	نام پرایمر	ژنوم توکسین
۱۱۶۷	۵`-aag att tgt aag gcg ctt۳-` ۵`-*att tcc tga aat cca ctc*۳-	Cpa f Cpa r	cpa/α
۱۰۲۵	۵`-agg agg ttt ttt tat gaa g۳-` ۵`-*tct aaa tag ctg tta ctt tgt g*۳-`	Cpb f Cpb r	cpb/β
۹۶۱	۵`-*aag ttt agc aat cgc atc*۳-` ۵`-*tat tcc tgg tgc ctt aat t*۳-`	Etx f Etx r	etx/ε
۸۲۱	۵`-*aat gcc ata tca aaa aat aa*۳-` ۵`-*tta gca aat gca ctc ata tt*۳-`	Lap f Lap r	iap/ι

جدول ۲- نحوه اجرای واکنش PCR

برنامه	مرحله	درجه حرارت	زمان	تعداد سیکل ها
۱	دناتوره کردن اولیه	۹۴ درجه	۵ دقیقه	۱ سیکل
۲	دناتوره کردن اتصال تکثیر	۹۴ درجه ۶۰ درجه ۷۲ درجه	۶۰ ثانیه ۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه	۲۵سیکل
۳	تکثیر نهایی	۷۲ درجه	۵ دقیقه	۱ سیکل

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- شرایط واکنش multiplex PCR

Material	۱	۲	۳	۴	۵	غلظت نهایی در هر تیوپ
Types	*A*	*B*	*C*	*D*	*Con*	
PCR buffer (10 x)	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	-
MgCL2 (50 mM)	۷	۷	۷	۷	۷	*3.5 mM*
dNTP5 (2.5 mM)	۸	۸	۸	۸	۸	*0.2 mM*
Primer cpa F (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Primer cpa R (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Primer cpb F (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Primer cpb R (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Primer etx F (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Primer etx R (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Primer iop F (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Primer iop R (10 pmol/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.1 pnol/*µl
Taq polymerase (5 U/ µl)	۱	۱	۱	۱	۱	*0.05 U/*µl
Template	۴	۴	۴	۴	---	-
D.D.W	۶۲	۶۲	۶۲	۶۲	۶۶	-
Total	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	-

پس از بهینه سازی واکنش PCR با استفاده از هر جفت پرایمر، واکنش Multiplex PCR با استفاده توام از چهار جفت پرایمر و DNA ژنومیک هر کدام از تایپ‌ها و با ترکیبات زیر در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر انجام گردید.

نتایج

از باکتری‌های تکثیر داده شده در محیط کشت استخراج DNA ژنومیک صورت گرفت و سپس واکنش PCR با استفاده از آن و پرایمرهای تهیه شده انجام گردید.

محصولات بدست آمده از واکنش فوق به همراه مارکر (PUC۱۸, Taq I) بر روی ژل ۱ درصد الکتروفورز گردید. نتایج واکنش PCR برای ژن cpa با استفاده از DNA ژنومیک برای هر چهار تایپ (A، B، C، D) نشان داد که همه تایپ‌ها دارای ژن cpa با وزن مولکولی ۱۱۶۷ جفت باز می باشند (شکل ۱، ستون ۲ تا ۵).

واکنش PCR برای مشخص نمودن ژن cpb با استفاده از DNA ژنومیک همه تایپ‌ها انجام گردید. نتیجه PCR برای تایپ‌های A و D منفی (شکل ۲، ستون‌های ۱ و ۴) و این تایپ‌ها فاقد ژن cpb بوده و

www.SID.ir

Archive of SID

برای تایپ‌های B و C واجد ژن cpb با وزن ۱۰۲۵ جفت باز (شکل ۲، ستون‌های ۲ و ۳) می‌باشند.

واکنش PCR برای تعیین وجود ژن etx با استفاده از DNA ژنومیک همه تایپ‌ها انجام گردید. نتیجه PCR حاصله برای تایپ‌های A وC منفی (شکل۳، ستون‌های ۲ و ۴) و برای تایپ‌های B و D که واجد این ژن با وزن ۹۶۱ جفت باز بود مثبت می‌باشد(شکل ۳، ستون‌های ۳ و ۵).

در شرایط مناسب، واکنش PCR برای ژن یوتا توکسین (iap) با استفاده از DNA ژنومیک برای هر چهار تایپ(A, B, C, D) انجام گردید که نتیجه PCR برای تمام تایپ‌های فوق منفی گردید.

پس از حصول نتایج مناسب در مرحله قبل واکنش Multiplex PCR برای چهار تایپ *C. perfringens* A،B،C،D طراحی، اجرا و بهینه‌سازی انجام گردید (شکل شماره ۴).

در تصویر ۴ ستون ۱ فاقد هر گونه باند به عنوان باکتری غیر *C. perfringens* شناسایی گردید. در ستون ۲ وجود یک باند ۱۱۶۷bp مربوط به ژن آلفاتوکسین تایپدکننده تایپ A بوده و در ستون ۳ وجود هر دو باند ۱۱۶۷ و ۱۰۲۵ جفت باز مربوط به هر دو ژن cpb،cpa نشان‌دهنده تایپ C می‌باشد. در ستون ۴ وجود دو باند ۱۱۶۷ و ۹۶۱ جفت باز مربوط به دو ژن cpa و etx تایپدکننده تایپ D بوده و در ستون ۵ وجود هر سه باند ۱۱۶۷ و ۱۰۲۵ و ۹۶۱ جفت باز مربوط به هر سه ژن cpb،etx، cpa نشان‌دهنده تایپ B می‌باشد. در ستون ۶ مارکر۱۰۰bp DNA ladder قابل مشاهده است.

تایید محصولات PCR

نتایج بررسی صحت محصولات PCR بوسیله واکنش برش آنزیمی انجام گردید. پس از بررسی قطعات تکثیر یافته توسط نرم افزار DNASIS، آنزیم Hind III جهت هضم این قطعات در نظر گرفته شد که پس از انجام هضم آنزیمی بر روی هر یک از قطعات نتایج آن در تصویر شماره ۵ مشاهده می شود. در این تصویر ستون ۱ فاقد آنزیم برش‌دهنده بعنوان کنترل بوده و باند مربوط به ژن cpa با ۱۱۶۷جفت باز را بدون برش آنزیمی نشان می‌دهد. آنزیم Hind III، ژن cpa با ۱۱۶۷جفت باز را به صورت کامل برش داده و در نتیجه این فرایند دو قطعه ۵۰۰ و ۶۶۷ جفت بازی ایجاد شده است (ستون ۲). ستون ۳ فاقد آنزیم برش‌دهنده بعنوان کنترل بوده و باند مربوط به ژن cpb با ۱۰۲۵ جفت باز را بدون برش آنزیمی نشان می دهد. آنزیم Hind III با برش در دو جایگاه ۵۲۵ و ۶۱۸ ژن cpb، آنرا به سه قطعه با اندازه‌های ۵۲۵، ۴۰۷ و ۹۳ جفت باز تبدیل نموده است (ستون ۴).

ژن etx دارای ۹۶۱ جفت باز با آنزیم Hind III با برش در جایگاه ۱۳۷ این ژن داده و آن را به دو قطعه به اندازه‌های ۱۳۷ و ۸۲۴ جفت باز تبدیل نموده است (ستون ۵). به دلیل هضم ناقص این قطعه باند ۹۶۱ نیز در تصویر مشاهده می‌شود.

بحث

بیماریزائی *C. perfringens* به وجود مهم‌ترین سم های اصلی و کشنده (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) آن مربوط می‌شود و بر اساس وجود این سموم در این باکتری آنها را به پنج تایپ A، B، C، D و E تقسیم‌بندی کرده‌اند (۲۷). جداسازی این باکتری از حیوانات مختلف و نیز پراکندگی جغرافیایی آن در تعیین تایپ باکتری موثر بوده است. (۴) همه سموم تولید شده توسط این باکتری از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند (۱۳). بتاتوکسین ایجاد نکروز روده‌ای (بیماری pigbel)، نکروز پوستی (dermonecrotic) و همچنین ایجاد زخم در سوختگی‌های پوستی می‌نماید (۱۰). اثر کشندگی آلفاتوکسین نیز بخاطر تخریب غشاء سلولی می‌باشد. به همین جهت این سم نقش مهمی در ایجاد قانقاریای گازی دارد. این سم می‌تواند فسفاتیدیل کولین و اسفنگومیلین را نیز هیدرولیز نماید. در موش سوری درصد LD۵۰ این سم ۵۰ نانوگرم می‌باشد.

روش‌های متعددی جهت شناسایی این باکتری از جمله روش بیوشیمیایی، سرولوژیکی و مولکولی ارائه شده است. روش بیوشیمیایی بسیار سخت، طولانی، پر هزینه، و با خطای زیاد همراه می‌باشد وحتی بعد از چندین روز آزمایش تنها گونه این باکتری قابل شناسایی خواهد بود وتشخیص تایپ آنها با این روش غیرممکن است. در روش دیگر (Toxinotyping) تعیین تایپ باکتری با استفاده از سم تولید شده توسط باکتری در محیط کشت انجام می‌گردد. این روش مبتنی بر تست خنثی سازی (نوترالیزاسیون) توکسین بوسیله آنتی توکسین‌های اختصاصی بوده و سپس با بررسی اثر کشندگی آن بر روی حیوانات آزمایشگاهی مانند موش یا مدل‌های محیط کشت (سلول‌های Vero) به ارزیابی سمیت یا خنثی شدگی سم اقدام می گردد (۵). در این روش جهت تایپ باکتری علاوه بر هزینه زیاد زمان زیادی مورد نیاز می‌باشد.

در روش شناسایی که مبتنی بر تولید آنتی سرم اختصاصی ضد چهار توکسین اصلی (آلفا،بتا، اپسیلون و یوتا توکسین) می‌باشد تعیین نوع تایپ *C. perfringens* با استفاده از وجود پادتن سطحی انجام می‌گیرد. مشکل این روش تهیه و خرید و نگهداری آنتی سرم است زیرا تنها تعداد کمی از آزمایشگاه‌های معتبر جهان اقدام به تولید آن می‌نمایند. نکته دیگر اینکه تنها حدود ۷۰ درصد از استرین‌های *C. perfringens*، قابلیت شناسایی با این روش را دارند (۲۷ ، ۳۰). در این روش اگر باکتری به هر دلیلی نتواند توکسین مورد نظر را تولید نماید، شناسایی دقیق باکتری دچار خطای احتمالی خواهد گردید. همچنین غیر فعال شدن آنتی سرم‌ها نیز (به هر دلیل) ایجاد جواب کاذب می‌نماید. گرانی نسبی، زمان طولانی و طول نیمه عمر فعالیت آنتی سرم‌ها از معایب این روش بشمار می‌آیند.

تکنیک PCR که امروزه از آن بطور وسیعی در مهندسی ژنتیک و تشخیص طیف گسترده‌ای از عوامل بیولوژیک استفاده می‌شود یک روش بسیار اختصاصی و در عین حال حساس برای شناسائی انواع ژن‌ها و عوامل بیولوژیک می‌باشد. این تکنیک ضمن سادگی، محدودیت‌های روش‌های فوق الذکر را ندارد و می‌توان از آن بطور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جهت شناسائی عوامل بیماری‌زا استفاده نمود. این روش مبتنی بر وجود یا عدم وجود توالی ژن‌های مربوط به چهار سم اصلی (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) در باکتری می‌باشد. این کار توسط Daublë و همکارانش در سال ۱۹۹۴ و سپس استفاده از پروپ ژن‌ها (با استفاده از PCR) توسط Songer در سال ۱۹۹۶ انجام شده است. استفاده از این روش اختصاصی برای تشخیص سریع بیماری‌های روده‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

کلستریدیال در حیوانات موفقیت‌آمیز بوده است (۲۲). Heikinheimo با استفاده از Multiplex PCR نسبت به شناسایی باکتری *C. perfringens* در ۱۱۸ جوجه اقدام نمود و تنها تایپ A این باکتری را توانست شناسایی نماید (۹). Uzal و همکارانش با استفاده از روش PCR نسبت به شناسایی ژن اپسیلون اقدام نمود (۲۹). Baums و همکارانش پروتکل جدیدی را جهت شناسایی و تعیین تایپ باکتری *C. perfringens* با استفاده از ژنوم باکتری پیشنهاد نمود(۴).

در این مطالعه، ازسویه‌های ایرانی جدا شده از مناطق طبیعی، استفاده گردید. یافته‌های بدست آمده از این سویه‌ها نشان داد که این سویه‌ها واجد ژن توکسین‌های اصلی فوق بوده و گزارش محققین دیگر را مورد تایید قرار داد (۱ ، ۲).

در این تحقیق پس از بهینه سازی شرایط PCR، جهت شناسایی *C. perfringens* با استفاده از ژن‌های استخراج شده از تایپ‌های مختلف سویه‌های این باکتری اقدام گردید. نتایج حاصل از این تحقیق این قابلیت را فراهم آورد که بتوان برای اولین بار در ایران با استفاده از DNA ژنومیک استخراج شده از تایپ‌های مجهول کلستریدیوم، آنها را شناسایی نمود.

با استفاده از این کیت تشخیص سریع قادر هستیم که در مدت زمان حدود ۴ ساعت با استفاده از DNA ژنومیک و با انجام یک واکنش PCR Multiplex و متعاقباً انجام یک ژل الکتروفورز برای محصولات PCR، نسبت به شناسایی کلستریدیوم پرفرنجنس اقدام نماییم. این تکنیک با توجه به سرعت، دقت و اختصاصیت می‌تواند به عنوان روش انتخابی جهت شناسایی و تعیین تایپ سویه‌های مختلف *C. perfringens* مورد استفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

۱- اولاد غ، سعادتی م، کمالی م، تولایی م، پیله چیان و موسوی (۱۳۸۳) شناسایی و تعیین تایپ کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ B بروش PCR. دومین همایش سراسری در برابر عوامل بیولوژیک.

۲- سعادتی م، اولاد غ، کمالی م، تولایی م، پیله چیان و موسوی (۱۳۸۳) شناسایی و تعیین تایپ کلستریدیوم پرفرنجنس تایپ C بروش PCR : دومین همایش سراسری در برابر عوامل بیولوژیک.

3- Augustynowicz, E., Gzyl, A. & lusarczyk, J. (2000) Molecular epidemiology survey of toxinogenic *Clostridium perfringens* strain types by multiplex PCR. *Scand. J. Infect. Dis*. 32, pp. 637–641.

4- Baums C. G., Schotte U., Amtsberg G &Goethe R. (2004) Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 20 May, Pages 11-16

5- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (1989) *Volum* 2 1179-1182.

6- Brana, K. 1999. Development and evaluation of various *enzyme- linked* immunosorbent assays for the detection of *Clostridium perfringenes*, anti-toxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 24; 293-297.

7- Daube. G., China. B., Simon. P., Hvala. K. & Mainil. J. (1994) Typing of *Clostridium perfringens* by *in vitro* amplification of toxin genes. *Jounal of Applied Bacteriology* 77,650-655

8- Garmory, H.S., Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G. & Titball, R.W. (2000) Occurence of *Clostridium perfringens* β2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect*. 124, pp. 61–67.

9- Heikinheimo A, Korkeala H. (2005) Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Lett Appl Microbiol*.;40(6):407-11

10- Julan. I. R. & Stewart. T. C. (1991) Molecular Genetics and Pathogenesis of *Clostridium perfringenes*. *Microbiological Reviews*. 621-648.

11- Kanakarj. R., Harris. D. L., Songer. J. G. & Bosworth. B. (1998) Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Vet. Microbiology*, 63, 29-38

12- Meer. R. R. & Songer. J. G. (1997) Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Closreidium perfringenes*. *AJVR*, 58, 702-70

13- McClane, B.A. (1996) An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon* 34, pp. 1335–1343.

14- McClane, B. A. (2001) *Clostridium perfringens,* p. 351-372. In L. R. Beuchat, M. P. Doyle, and T. J. Montville ed., Food microbiology: fundamentals and frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

15- McCourt M. T, Finlay D. A, Laird C, Smyth J. A, Bell C, Ball H. J. (2005) Sandwich ELISA detection of *Clostridium perfringens* cells and alpha-toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry.Vet Microbiol;106: 259-64

16- Miyamoto, K., Wen Q. & McClane, B. A. (2004) Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type a carrying a chromosomal enterotoxin gene cpe locus, a plasmid cpe locus with an is1470-like sequence, or a plasmid cpe locus with an is1151 sequence. *J Clin Microbiol*. 424: 1552–1558.

17- Nagahama, M., Kobayashi, K., Ochi, S. & Sakurai, J. (1991) Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostidium perfringens*. *FEMS Microb*. Lett. 84: 41-44

18- Naylor, R. D., Martin, P. K. & Sharpe, R. T. (1987)Dtection of *Clostidium perfringens* epsilon toxin by ELISA. *Res.Vet*. Sci. 42: 255-256.

19- Newton. C. R. & GRAHAM. A. (1994) PCR. Oxford, bios,

www.SID.ir

Archive of SID

27- TOPLY & Wilson, S. (1998) *Principles of bacteriology virology and immunity. Vol* 2: *systematic bacteriology*. Chapter 32: Clostridium: the spore-bearing anaerobes. Hatheway C. L., and Johnson E. A., Edward Aruold, 732-785.

28- Twetwn. R. K. (2001) *Clostridium perfringenes* beta toxin and Clostridium septicum alpha toxin: Their mechanisms possible role in pathogenesis. *Vet*. *Microbiology*, 82 ,1-9

29- Uzal FA, Plumb JJ, Blackall LL, O'Boyle D, Kelly WR. (1996) Detection by polymerase chain reaction of *Clostridium perfringens* producing epsilon toxin in faeces and in gastrointestinal contents of goats. *Lett Appl Microbiol*. 23(1):13-7.

30- Yoo.H. S., Lee. S. U., Park. K. Y. & Park. Y. H. (1997) Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 228-232

31- Wen, Q. & McClane B. A. (2004) Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Type A isolates in American retail foods. *Appl Environ Microbiol.* 705: 2685–2691.

32- Wolfgang. K. & Jokli K. (1986) *Zinsser microbiology*. 20th edition. Appleton and Lange. Chapter 44: Closteridium.: 636-657.

33- Zynkind & Bernsrtein. (1992) *Rcombinant DNA Laoratory Manual , Protocols* Scientific Publisher

20- Petit. L., Gibeert. M. & Popoff. M. R. (1999) *Clostridium perfringenes*: toxinotype and genotype. Trends Microbiol; 73 104-110

21- Sakuri. J. (1999) Hemorrhagic enteritis associated with *Clostridium perfringenes* type A in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 61:175-177

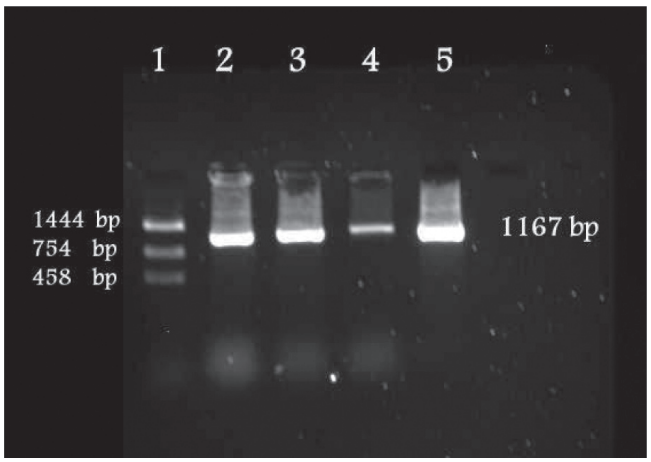
22- Sakuri. J. & MEER. R. R. (1996) Genotyping of *Clostridium perfringenes* by Polymerase Chain Reactions is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe* 2: 17-22

23- Songer, J. G. (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. *Microbiol. Rev*. 9:216-234

24- 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*, 197–203.

25- Sterne, M., Batty, I. (1975) *Pathogenic Clostridia*. Butterworths, London, pp. 79–122.

26- Thiede, S., Goethe, R. & Amtsberg, G. (2001) Prevalence of beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* type A from diarrhoeic dogs. *Vet. Rec.* 149, 273–274.



تصویر ۱- شناسایی ژن cpa که بوسیله PCR تکثیر یافته بود. ژنوم سویه‌های *Clostridium perfringens* تایپ‌های A،B،C،D به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. ژن cpa در هر سویه بوسیله پرایمر اختصاصی تکثیر یافت. ژن تکثیر یافته به ژل آگاروز ۱ درصد منتقل و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

ستون ۱- شاخص وزنی pUC۱۸ -Taq I،

ستون ۲- محصول PCR ژن cpa در تایپ A

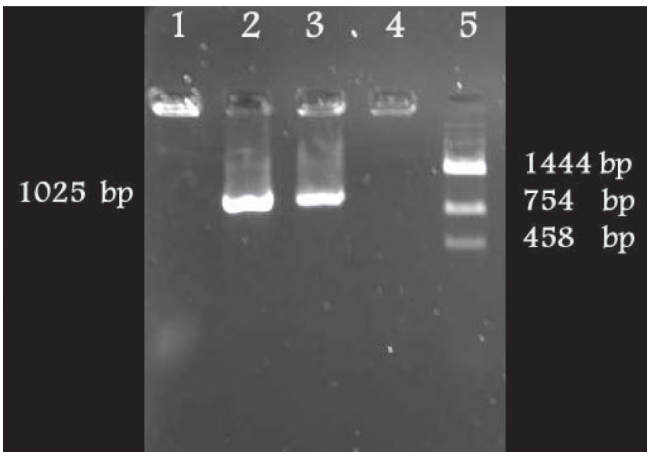
ستون ۳- محصول PCR ژن cpa در تایپ B

ستون ۴- محصول PCR ژن cpa در تایپ C

ستون ۵- محصول PCR ژن cpa در تایپ D

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۲- شناسایی ژن cpb که بوسیله PCR تکثیر یافته بود. ژنوم سویه‌های *C. perfringens* تایپ‌های A،B،C،D به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. ژن cpb در هر سویه بوسیله پرایمر اختصاصی تکثیر یافت. محصول PCR به ژل آگاروز ۱ درصد منتقل و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. شاخص وزنی pUC۱۸ -Taq I به عنوان مارکر مورد استفاده قرار گرفت.

محصول PCR ژن cpb در سویه‌های مورد آزمایش:

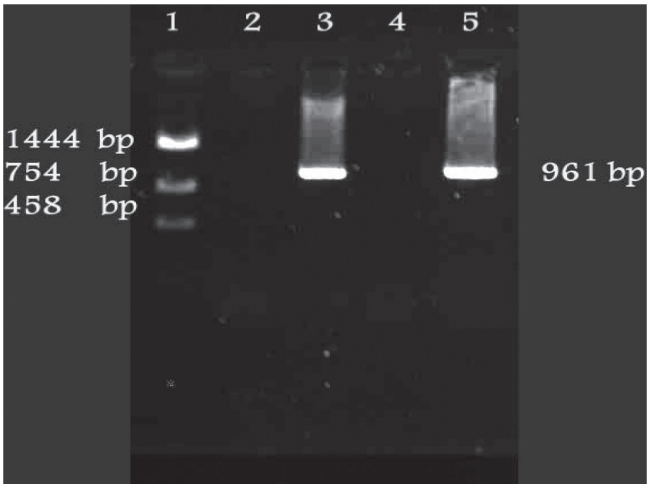
ستون ۱- تایپ A (فاقد ژن cpb)

ستون ۲- تایپ B (دارای ژن cpb)

ستون ۳- تایپ C (دارای ژن cpb)

ستون ۴- تایپ D (فاقد ژن cpb)

ستون ۵- شاخص وزنی pUC۱۸ -Taq I



تصویر ۳- شناسایی ژن cpx که بوسیله PCR تکثیر یافته بود. ژنوم سویه‌های *C. perfringens* تایپ‌های A،B،C،D به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. ژن cpx در هر سویه بوسیله پرایمر اختصاصی تکثیر یافت. ژن تکثیر یافته به ژل آگاروز ۱ درصد منتقل و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. شاخص وزنی pUC۱۸ -Taq I به عنوان مارکر مورد استفاده قرار گرفت.

ردیف ۱- شاخص وزنی pUC۱۸ -Taq I،

ردیف ۲- محصول PCR ژن etx تایپ A (منفی)

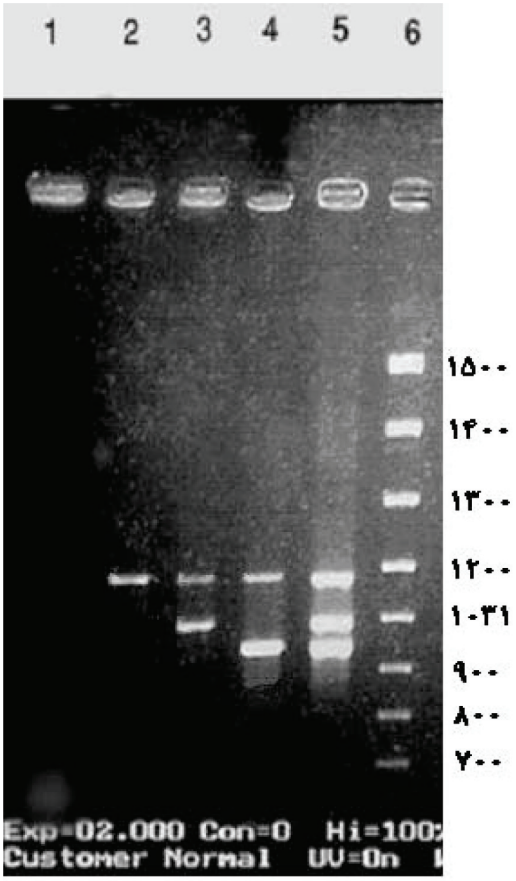
ردیف ۳- محصول PCR ژن etx تایپ B (مثبت)

ردیف ۴- محصول PCR ژن etx تایپ C (منفی)

ردیف ۵- محصول PCR ژن etx تایپ D (مثبت

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۴- تایپ کردن *C. perfringens* بوسیله Multiplex PCR

سویه‌های *C. perfringens* تایپ‌های A،B،C،D به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. ژن مورد نظر در هر سویه بوسیله پرایمر اختصاصی تکثیر یافت. ژن تکثیر یافته به ژل آگاروز ۱ درصد منتقل و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. شاخص وزنی ۱۰۰ جفت باز به عنوان مارکر مورد استفاده قرار گرفت.

ستون۱- کلستریدیوم بوتولینیوم فاقد باند

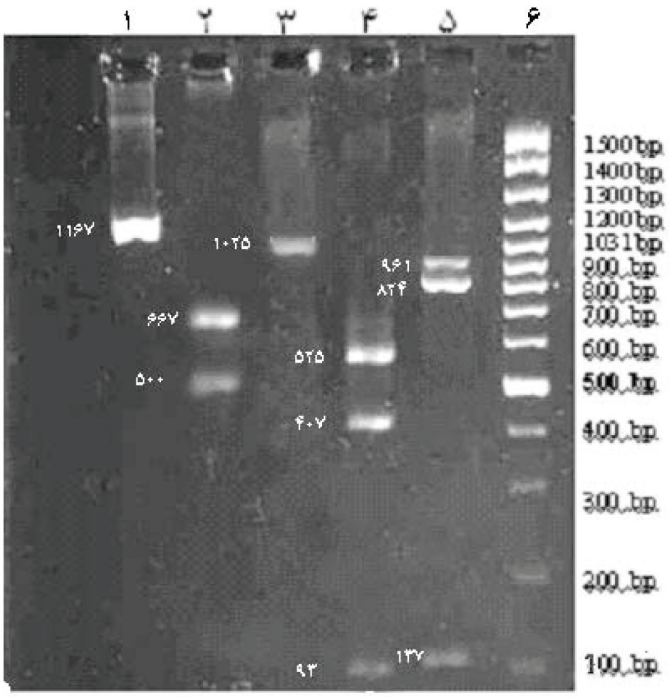
ستون۲- تایپ A کلستریدیوم پرفرنجنس باند cpa

ستون۳- تایپ C کلستریدیوم پرفرنجنس باند cpa,cpb

ستون۴- تایپ D کلستریدیوم پرفرنجنس باند cpa,etx

ستون۵- تایپ B کلستریدیوم پرفرنجنس باند cpa, cpb, etx

ستون۶- مارکر ۱۰۰bp DNA ladder



تصویر شماره ۵: آنالیز محصولات PCR برای هر سه ژن cpa, cpb, etx بوسیله آنزیم Hind III بر روی ژل الکتروفورز

ستون ۱: محصولات PCR ژن cpa بدون برش

ستون ۲: قطعات حاصل ازبرش کامل ژن cpa

ستون ۳: محصولات PCR ژن cpb بدون برش

ستون ۴: قطعات حاصل ازبرش کامل ژن cpb

ستون ۵: محصولات PCR برای ژن etx بوسیله آنزیم Hind III

ستون ۶: نشان گر ۱۰۰bp

www.SID.ir