مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۲، ۱۴۰۰، ۲۷۶-۲۶۸
مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های مولکولی و توکسیژنیک جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B از گوسفند و بره

لیدا عبدالمحمدی خیاو، علیرضا پردیس

بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۵. بهمن ماه۱۳۹۹، **تاریخ پذیرش:** ۲۲. فروردین ماه ۱۴۰۰

10.22059/jvr.2020.296158.3015 https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.14.4

چکیده

زمینهٔ مطالعه: *کلستریدیوم پرفرینجنز* یک پاتوژن مهم در حیوانات می‌باشد که خسارات سنگینی را به صنعت دامپروری و طیور وارد می‌سازد. بنابراین تشخیص این باکتری از اهمیت برخوردار می‌باشد.

هدف: استفاده از روش‌های مرسوم و مولکولی جهت شناسایی و بررسی میزان توکسین‌زایی جدایه‌های ایرانی.

روش‌کار: در مطالعه حاضر، ۲۳ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B توسط آزمون‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی بررسی شدند. سپس جهت تأیید نهایی مورد آزمون PCR قرار گرفتند. پس از کشت جدایه‌ها در محیط مخصوص، تست حداقل دز کشندگی انجام گردید. از توکسیژنیک‌ترین جدایه ایرانی و سویه رفرنس، واکسن آناکالچر انتروتوکسمی تهیه گردید. بر روی واکسن‌های آزمایشی غیرفعال، آزمون خنثی‌سازی سرم انجام گرفت.

نتایج: مطالعه حاضر نشان داد تمام جدایه‌ها ژن *etx* و *cpb* را حمل نموده ولی ۶۵/۲ درصد جدایه‌ها ژن *cpb2* را حمل می‌نمایند. حداقل میزان دز کشندگی برای این باکتری محدوده کمتر از ۱/۱۰ تا بیشتر از ۱/۹۰۰ بود. نتایج سرم نوترالیزاسیون در جدایه ایرانی و سویه رفرنس به ترتیب ۵ و ۱۰ واحد بین الملل در میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جدایه ۱۷۹۵ با قدرت توکسین‌زایی بالا، امکان استفاده در تولید واکسن دارد. البته برای استفاده در تولید نیازمند تحقیقات بیشتر بر روی حیوانات هدف است.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم پرفرینجنز*، PCR، حداقل دز کشندگی، سرم نوترالیزاسیون، آنتی‌توکسین استاندارد

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: لیدا عبدالمحمدی خیاو، بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: mohammadimail1396@gmail.com

مقدمه

بیماری‌های باکتریایی سالانه باعث تلف شدن تعداد قابل ملاحظه‌ای دام و طیور می شوند و خسارات جانی و مالی فراوانی به بار می‌آورند که نیاز به مواد غذایی به خصوص مواد پروتئینی را دو چندان می‌نماید. *کلستریدیوم* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بی‌هوازی اسپوردار بوده که نقش مهمی در بیماریزایی انسان و حیوانات دارند. تاکنون بیش از ۲۰۰ گونه از این جنس شناسایی شده که ۳۰ گونه آن بیماریزا می‌باشند (۲۴). از بین گونه‌های بیماریزا *کلستریدیوم پرفرینجنز* (*Clostridium perfringens*) عامل بیماری‌های مختلف در دام شامل انتروتوکسمی، قلوه نرمی، اسهال عفونی بره‌های نوزاد، استراک و آنتریت هموراژیک می‌باشد. همچنین در انسان مسمومیت غذایی پیگ بل و گاز گانگرن را ایجاد می‌نماید. *کلستریدیوم پرفرینجنز* بر اساس توکسین‌های اصلی کشنده به پنج تیپ A تا E تقسیم می‌شود. (۱۱) *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B توکسین‌های اصلی آلفا، بتا و اپسیلون را تولید می‌نماید. آلفا توکسین خاصیت کشندگی نکروتیک

همولیتیک و لیسیتیناز دارد (۳۲). بتاتوکسین نیز خاصیت کشندگی و نکروتیک دارد. ژن بتاتوکسین (*cpb*) بر روی پلاسمیدهایی با وزن ۶۵ تا ۱۱۰ کیلو باز قرار دارد (۳۱) این ژن پروتوکسین ۳۳۶ آمینو اسیدی را کد کرده که دارای سیگنال پپتید ۲۷ اسیدآمینه‌ای بوده که در حین خروج از سلول حذف شده و نهایتاً یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۵ کیلو دالتون ایجاد می‌شود (۳۴). اپسیلون توکسین به صورت پروتوتوکسین غیر فعال ترشح شده (۸) و توسط آنزیم‌هایی تریپسین و کموتریپسین با حذف ۱۳ اسیدآمینه و ۲۰ اسیدآمینه از قسمت انتهای آمینی و کربوکسیل به صورت فعال در می‌آید (۲۶). این توکسین خاصیت درمونکروتیک و انتروتوکسیک دارد. در جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B ژن *cpb2* بر روی پلاسمید ۶۵ کیلوبایت حاوی ژن *etx* قرار گرفته است. پروتئین بتا ۲ توکسین متشکل از یک پلی‌پپتید ۲۶۵ اسیدآمینه‌ای بوده که پس از ترشح ۳۰ اسیدآمینه را از دست می‌دهد و نهایتاً یک پروتئین با وزن مولکولی ۲۷/۶ کیلو دالتون ایجاد می‌شود (۱۲).

کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B عامل انتروتوکسمی گوسفند و بز و اسهال عفونی بره می‌باشد. باکتری از طریق مدفوع دام آلوده دفع گردیده و خاک را آلوده می‌سازد و از راه دستگاه گوارش وارد بدن می‌گردد (۱۵،۱۶) در شرایط مناسب تحت اثر تغییرات ناگهانی جیره غذایی باکتری به سرعت تکثیر یافته و با تولید توکسین بیماری ظاهر می‌گردد. بیماری عموماً در حیوانات پروار ظاهر می‌شوند و به سرعت، بدون هیچ علائم بالینی خاص مرگ رخ می‌دهد. اولین مورد انتروتوکسمی در سال ۱۹۳۶ در گوسفندان مرینو حوالی تهران مشاهده و گزارش شد. مطالعات بیشتر موید عفونت وسیع و گسترده در سراسر کشور بود (۴). اولین مورد واریانت ایرانی *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B در سال ۱۹۵۴ از روده گوسفندان و بزهای مبتلا به انتروتوکسمی جدا گردید (۵). مطالعات انجام شده بر روی واریانت ایرانی *کلستریدیوم پرفرینجنز* نشان داد که با تیپ کلاسیک آن متفاوت می‌باشد و در کتاب میکروبیولوژی دامپزشکی به این مطلب اشاره شده است (۳). جداسازی و تشخیص *کلستریدیوم*های پاتوژنیک از حیوانات بیمار در سال ۱۹۸۸ انجام شد. نتایج نشان داد از ۲۲۱ نمونه، ۲۲ سویه (۹/۹۵ درصد) متعلق به *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B بود (۵). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Ardehali در سال ۱۹۹۴ بر روی *کلستریدیوم*های خاک انجام شد *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B را در هیچ موردی جداسازی و گزارش ننمود (۶). Ghazi در سال ۱۹۹۷ نیز، هفده سویه *کلستریدیوم پرفرینجنز* پس از مرگ گوسفند و بز ایزوله گردیده و توسط آزمون‌های بیوشیمیایی و آنزیم ایمونواسی مورد بررسی قرار گرفتند (EIA) که هفت مورد (۴۱/۱درصد) از این جدایه‌ها متعلق به *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B بودند (۱۸). مطالعات دیگری نیز در این زمینه به صورت پراکنده در کشور انجام شد. با توجه به خسارت‌های اقتصادی ناشی از بیماری‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز* در صنعت دامپروری و طیور، شناسایی و بررسی ویژگی‌های دقیق جدایه‌های ایرانی از اهمیت خاصی برخوردار است. همچنین از جدایه‌های بومی می‌توان در تولید واکسن‌های مؤثر استفاده کرد. این امر ضرورت مطالعات بیشتر در زمینه تایپینگ جدایه‌های ایرانی و آزمون سنجش حداقل دز کشندگی و آزمون خنثی‌سازی سرم را مطرح می‌نماید. لذا هدف از این مطالعه دانش بیشتر در زمینه تایپینگ و بررسی توکسیژنیسیته جدایه‌های ایرانی می‌باشد.

مواد و روش کار

جدایه‌های باکتریایی و سویه‌های رفرنس: از ۲۳ جدایه لیوفیلیزه *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B کلکسیون بخش واکسن‌های بی‌هوازی موسسه رازی استفاده گردید که در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. اطلاعات مربوط به جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B در جدول ۱ آورده شده است. از سویه استاندارد رفرنس CN228، CN301، CN409 و CN913 به عنوان کنترل برای پژوهش استفاده گردید.

تهیه محیط کشت مایع جگر و کشت: تکه‌های جگر را در لوله آزمایش ریخته و ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره جگر گوسفند به آن اضافه شد. سپس جدایه در آن تلقیح شده و در شرایط بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و توسط آزمون‌های میکروبیولوژیک همولیز بر روی خون گوسفند، رنگ آمیزی گرم و حرکت (۲۳) و آزمون‌های بیوشیمیایی تخمیر قند، آزمون ژلاتیناز، اندول، هضم شیر، لیسیتیناز و کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند (۳۳). سپس آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به منظور تأیید نهایی با استفاده از پرایمرهای توکسین باکتری بر روی جدایه‌ها و سویه‌های رفرنس انجام شد.

تخلیص DNA: جدایه‌ها و سویه‌های رفرنس *کلستریدیوم پرفرینجنز* در محیط کشت مایع جگر تلقیح و در شرایط بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. پس از رشد باکتری و سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، به رسوب آن ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE1X اضافه گردید. به این سوسپانسیون پس از سانتریفوژ، ۲۵ میکرولیتر لیزوزیم (۱۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید در ادامه به میکروتیوب) ۳۰۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد (۱۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) اضافه

گردید و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون ۵ میکرولیتر پروتئیناز K (۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) اضافه و برای ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس طی دو بار با مخلوط فنل کلروفرم استخراج گردید. به فاز رویی به نسبت یک دهم حجم استات سدیم ۳ مولار و یک حجم ایزوپروپانل سرد اضافه نموده و به منظور ترسیب، نمونه در فریزر قرار داده شد. پس از سانتریفوژ به رسوب حاصله ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۵ درصد اضافه و سانتریفوژ گردید. سپس رسوب به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۵ درجه قرار گرفت و ۳۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد (۲۹).

بررسی کیفیت و کمیت DNA تخلیص شده: جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ بر اساس روش اسپکتروفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد.

آزمون PCR برای تعیین هویت توکسین اپسیلون، بتا و بتا۲: برای PCR ، ۱ میکرولیتر DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم/ میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X(غلظت نهایی X۱)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مول (غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مول)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مول (غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مول)، ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA پلی مراز ۵ واحد در میکرولیتر (غلظت نهایی ۲ واحد)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر رفت و برگشت ۱۰ پیکو مول در میکرولیتر (غلظت نهایی ۱۰ پیکومول) (سیناژن) و آب دو بار تقطیر اضافه نموده تا حجم نهایی مخلوط واکنش به ۲۵ میکرولیتر برسد. پرایمرهای PCR در جدول ۲ آورده شده که از ژن توکسین اپسیلون *etx* بتاتوکسین *cpb* و بتا۲ توکسین (*cpb2*) گرفته شد. در کنترل مثبت *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B از سویه رفرنس CN228 و برای کنترل مثبت *کلستریدیوم پرفرینجنز* از CN301 و CN409 و در کنترل منفی *کلستریدیوم پرفرینجنز* از CN913 و در کنترل منفی دوم بجای DNA الگو آب دو بار تقطیر ریخته شد. نمونه در دستگاه ترموسایکلر (شرکت اپندورف) قرار گرفت تا PCR انجام شود. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۶۰ ثانیه در ۹۵ درجه، ۶۰ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی‌گراد، ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و متعاقب آن گسترش برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس محصول PCR با لودینگ بافر X ۵ مخلوط و درون چاهک‌های ژل آگاروز ۱ درصد (شرکت Invitrogen® آمریکا) ریخته شد و پس از الکتروفورز با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) (شرکت سیناژن، ایران) رنگ آمیزی گردید. در نهایت توسط دستگاه ژل داک (شرکت BioRad® آمریکا) عکس برداری شد.

انتخاب مناسب‌ترین محیط کشت جهت توکسین زایی

تهیه محیط کشت‌های اختصاصی و کشت:

۱. محیط کشت TYG حاوی soy tryptic broth ۳ درصد، گلوکز ۲ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد و سیستیین ۱ درصد
۲. محیط کشت TPYG حاوی پپتون گوشت ۵ درصد، پپتون پرتئوز ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، گلوکز ۰/۵ درصد، سدیم تایوگلیکولات ۰/۱ درصد و سیستیین ۰/۰۵ درصد
۳. محیط کشت حاوی پپتون۳ درصد، نمک ۰/۲۵ درصد، دی سدیم فسفات ۱ درصد، گلوکز۱ درصد، تریس ویتامین ۰/۷۵درصد
۴. محیط کشت حاوی پپتون گوشت ۳ درصد، پپتون پرتئوز ۲ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد، گلوکز ۱ درصد، پودر جگر ۰/۷۵ درصد، سیستیین ۰/۱ درصد، گوشت قطعه شده ۱۰ درصد، ویتامین‌ها و عناصر معدنی کمیاب ۰/۷۵ درصد، نمک ۰/۲۵ درصد و دی سدیم فسفات ۱ درصد

پس از کشت سویه رفرنس در ۴ محیط فوق الذکر، تست حداقل دز کشندگی (MLD) به منظور مقایسه توکسین‌زایی در مناسب‌ترین محیط کشت انجام گردید. نتایج بررسی نشان داد که مناسب‌ترین محیط کشت جهت توکسین‌زایی، محیط کشت حاوی ویتامین‌ها و عناصر معدنی کمیاب بود.

کشت: جدایه‌ها را داخل محیط کشت مایع جگر تلقیح نموده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی انکوبه کرده، به عنوان کنترل منفی از محیط کشت تریپتیکیز سوی براس در شرایط هوازی و به عنوان کنترل مثبت از سویه رفرنس *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت سوسپانسیون در محیط کشت اختصاصی حاوی ویتامین‌ها و عناصر معدنی کمیاب تلقیح و در شرایط بی‌هوازی به مدت ۵ ساعت انکوبه گردید. سپس تست MLD بر روی نمونه‌ها انجام گردید.

تست حداقل دز کشندگی (MLD): دو میلی‌لیتر از هر نمونه را در دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ نموده سپس از سوپرناتانت رقت‌های مختلف توسط نرمال سالین (pH=۷) تهیه نموده (از رقت ۱/۱۰ الی ۱/۹۰۰) و ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت به دو موش N.M.R.I ۱۷-۲۲ گرمی به صورت داخل وریدی در ناحیه دم تزریق شد. آخرین رقت مرگ و میر به عنوان نتیجه MLD گزارش شد (۲۷).

از توکسیژنیک‌ترین جدایه آرشیو و سویه رفرنس، دو واکسن آناکالچر آزمایشی با نسبت‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D (سویه رفرنس) ۶۰ درصد، *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B (جدایه توکسیژنیک) ۱۰ درصد، *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C (سویه رفرنس) ۱۰ درصد، *کلستریدیوم سپتیکوم* (سویه رفرنس) ۱۰ درصد و ۱۰ درصد آب مقطر تهیه نموده، پس از تنظیم PH و دتوکسیفیکاسیون سوسپانسیون با افزودن فرمالدئید (۰/۶درصد) آزمون‌های بی‌ضرری و باقیمانده سمیت انجام شد.

آزمون بی‌ضرری: واکسن‌های آزمایشی به صورت زیر جلدی به هشت راس گوسفند ۴۰ کیلوگرمی به میزان ۲/۵ و۵ میلی‌لیتر تزریق شد. پس از ۱۴ روز حیوانات مورد تزریق مجدد به همان شیوه قرار گرفتند و به مدت ۷ روز تحت نظر قرار گرفتند (۱۴).

آزمون باقیمانده سمیت: واکسن آزمایشی به ۵ موش به صورت زیر جلدی به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر تزریق و موش‌ها به مدت ۷ روز تحت نظر قرار گرفتند (۱۴).

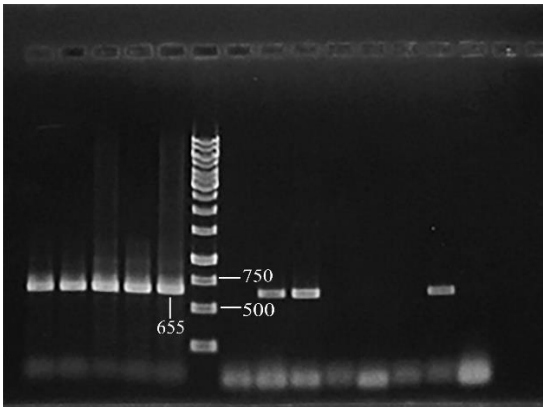
پس از ۴۵ روز سردخانه گذاری آزمون خنثی‌سازی سرم انجام شد. برای تهیه سرم خرگوش ۳ میلی‌لیتر نمونه واکسن‌ها به ۱۲ خرگوش ۳ کیلوگرمی به صورت زیر جلدی تزریق شد. پس از ۲۸ روز تزریق یادآور و ۱۴ روز بعد از تزریق دوم خونگیری از قلب خرگوش‌ها انجام شد. سپس جدا سازی سرم‌ها و میزان آنتی‌توکسین بتا اندازه‌گیری شد.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B.

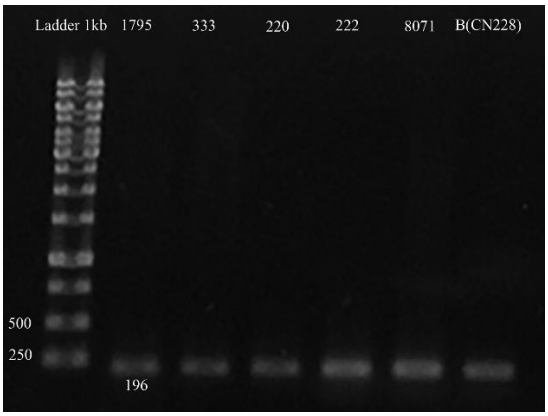
سوش	گونه حیوان	محل جداسازی	نتیجه آزمون MLD
۲۱۹	روده گوسفند	خرم آباد	۱/۱۰۰
۲۳۸	روده گوسفند	انستیتو پاستور	<۱/۱۰
۲۱۶	گوسفند	کرج	۱/۱۰
۲۲۰	روده گوسفند	نامشخص	۱/۷۰۰
۲۱۳	روده بره	نامشخص	۱/۷۰۰
۳۳۳	روده گوسفند	نامشخص	۱/۷۰۰
۲۲۷	روده بره	نامشخص	۱/۴۰۰
۲۱۴	روده گوسفند	اسفراین	۱/۵۰۰
۲۲۱	روده گوسفند	نامشخص	۱/۵۰۰
۱۷۹۵	روده گوسفند	نامشخص	۱/۹۰۰
۲۳۶	روده گوسفند	نامشخص	۱/۱۰
۲۲۲	روده گوسفند	بروجرد	۱/۷۰۰
۸۰۷۱	روده گوسفند	نامشخص	۱/۷۰۰
۲۳۹	روده گوسفند	نامشخص	۱/۳۰۰
۲۳۴	روده گوسفند	نامشخص	۱/۵۰
۲۳۷	روده گوسفند	حیدرآباد	<۱/۱۰
۲۱۵	روده گوسفند	اسفراین	۱/۵۰
۲۱۰	روده گوسفند	نامشخص	۱/۵۰۰
۲۲۸	روده گوسفند	نامشخص	۱/۶۰۰
۲۳۳	روده گوسفند	نامشخص	۱/۳۰۰
۲۳۱	روده گوسفند	نظرآباد	<۱/۱۰
۲۰۷	روده گوسفند	نامشخص	۱/۳۰۰
۲۴۰	روده گوسفند	نامشخص	۱/۷۰۰

جدول ۲. توالی‌های پرایمرهای اولیگونوکلئوتید، نام ژن و طول محصول PCR.

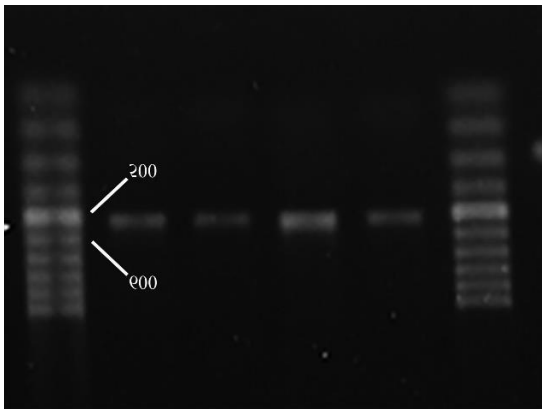
نام ژن	پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (۵'-۳')	آمپلیکون	منبع
etx	etxF	GCGGTGATATCCATCTATTC	۶۵۵ جفت باز	(۲۲)
etx	etxR	CCACTTACTTGTCCTACTAAC	۶۵۵ جفت باز	(۲۲)
cpb	cpbR	GCAGGAACATTAGTATATCTTC	۱۹۶ جفت باز	(۲۱)
cpb	cpbF	GCGAATATGCTGAATCATCTA	۱۹۶ جفت باز	(۲۱)
*cpb*2	*cpb*2R	CAATACCCTTCACCAAATACTC	۵۶۷ جفت باز	(۱۷)
*cpb*2	*cpb*2F	AGATTTTAAATATGATCCTAACC	۵۶۷ جفت باز	(۱۷)



تصویر ۱. تکثیر قطعه ۶۵۵ جفت باز اپسیلون توکسین.



تصویر ۲. تکثیر قطعه ۱۹۶ جفت باز بتاتوکسین.



تصویر ۳. تکثیر قطعه ۵۶۷ جفت باز بتا۲ توکسین.

به مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر از بتاتوکسین، ۱۰۰۰ میکرولیتر آنتی‌توکسین استاندارد بتا (۲/۵ واحد بین الملل/ میلی‌لیتر) اضافه نموده و با سرم فیزیولوژی به حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت به دو موش N.M.R.I ۲۲-۱۷ گرمی به صورت داخل وریدی در ناحیه دم تزریق شد. بالاترین رقتی که موش‌ها زنده ماندند به عنوان نتیجه تست دز توکسین بتا برای آزمون خنثی‌سازی سرم استفاده شد. جهت آزمون خنثی‌سازی سرم به مقادیر ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ میکرولیتر از آنتی‌توکسین استاندارد بتا (۲/۵ واحد بین الملل/ میلی‌لیتر)، ۱۰۰۰ میکرولیتر بتاتوکسین (رقت حاصل از تست دز توکسین بتا) اضافه نموده و با سرم فیزیولوژی به حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ میکرولیتر از سرم خرگوش، به ۱۰۰۰ میکرولیتر بتاتوکسین اضافه نموده و با سرم فیزیولوژی به حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون، ۰/۵ میلی‌لیتر از هررقت به دو موش به صورت داخل وریدی تزریق گردید. در نهایت میزان آنتی‌توکسین سرم خرگوش جدایه و سویه واکسینال با مقایسه آنتی‌توکسین استاندارد بر حسب واحد بین الملل محاسبه گردید (۱۴).

نتایج

جدایه‌ها 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 شیر بودند ولی اندل، حرکت و کاتالاز منفی بودند. تمامی جدایه‌ها بر روی محیط کشت حاوی خون گوسفند فعالیت همولیتیک داشته و در محیط کشت اختصاصی رشد مناسبی داشتند. در رنگ آمیزی گرم جدایه‌ها باسیل گرم مثبت مشاهده شد. DNA ژنومیک تخلیص شده از کیفیت و کمیت مناسبی برخوردار بود. در آزمون PCR همه جدایه‌های تحت آزمون، قطعه‌ای به طول ۶۵۵ جفت باز اپسیلون توکسین (تصویر ۱) ۱۹۶ جفت باز بتاتوکسین (تصویر ۲) تکثیر نمودند و بدین ترتیب تعلق همه آن‌ها به *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B آشکار گردید. ولی ۶۵/۲ درصد جدایه‌ها قطعه‌ای به طول ۵۶۷ جفت باز بتا ۲ توکسین (تصویر ۳) تکثیر نمودند. همچنین در کنترل با سویه‌های رفرنس منفی باندی مشاهده نشد. نتایج حداقل میزان دز کشندگی برای این باکتری محدوده کمتر از ۱/۱۰ تا بیشتر از ۱/۹۰۰ بود. جدایه $B_{۱۷۹۵}$ بالاترین میزان توکسین‌زایی را داشت (جدول ۱).

نتایج بی‌ضرری و باقیمانده سمیت واکسن عارضه‌ای را در گوسفندان و موش‌ها ایجاد ننمود و واکسن تهیه شده بی‌ضرر و سالم بود. نتایج سرم نوترالیزاسیون رقت ۰/۴ آنتی‌توکسین

استاندارد بتا، رقت ۰/۱ آنتی‌سرم رفرنس و رقت ۰/۲ آنتی‌سرم جدایه را نشان داد. لذا مقدار آنتی‌سرم جدایه و آنتی‌سرم رفرنس به ترتیب ۵ و ۱۰ واحد بین الملل در میلی‌لیتر بود.

۵X=۲/۵×۲ واحد بین الملل/ میلی‌لیتر

۱۰X=۲/۵×۴ واحد بین الملل/ میلی‌لیتر

بحث

*کلستریدیوم*ها عامل بیماری‌های متعددی مانند انتروتوکسمی، اسهال خونی بره، انتریت نکروتیک و استراک در حیوانات بوده و از عوامل مهم خسارات اقتصادی به صنعت دامپروری می‌باشند. یکی از گونه‌های مهم آن *کلستریدیوم پرفرینجنز* بوده که همواره توجه ویژه‌ای در سطح جهان به آن می‌شود. آزمون‌های متعددی برای تشخیص *کلستریدیوم پرفرینجنز* منجمله آزمون‌های میکروبی و بیوشیمیایی ذکر گردیده است (۲۳). لیکن در کنار محاسن، آن‌ها دارای معایبی می‌باشند که از جمله آن‌ها به عدم تمایز و تفکیک تیپ‌ها، زمان‌بر بودن، حساسیت پایین آزمون‌ها، میزان نسبتاً زیاد باکتری جهت حصول نتیجه در محیط کشت و نیاز به محیط‌های متعدد می‌توان اشاره کرد. در مطالعه حاضر نتایج مشابهی به دست آمد. این باکتری به سرعت تکثیر شده و توکسین‌های متعددی را تولید می‌نماید. ارزیابی توکسین‌ها جهت تشخیص به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های مبتنی بر ایمنودیفیوژن و ایمونوبلاتینگ در این راستا قرار می‌گیرند. Aschfalk و همکاران در سال ۲۰۰۲ از آنزیم ایمونواسی (۷) و Gokce و همکاران در سال ۲۰۰۷، Gokce و Hadimli و همکاران در سال ۲۰۱۲ از الایزا برای تشخیص توکسین این باکتری استفاده کردند (۲۰). همچنین سنجش بیولوژیک به عنوان یکی از روش‌های مهم اشاره می‌شود. لیکن این روش طولانی بوده و به ۲۴ تا ۴۸ ساعت زمان نیاز دارد. علاوه بر این بعضی جدایه‌ها توانایی توکسین‌زایی نداشته یا قدرت توکسین‌زایی به قدری پایین بوده که امکان سنجش آن وجود ندارد. مضافاً وجود آنتی بادی‌های پلی کلونال باعث واکنش غیر اختصاصی توکسین و آنتی بادی پلی کلونال شده لذا تایپینگ را دچار اختلال می‌نمایند. Al-Khaldi و همکاران در سال ۲۰۰۴ از روش Multiple oligonucleotide microarray hybridization جهت تشخیص *کلستریدیوم پرفرینجنز* و بررسی میزان توکسین‌ها و ژن‌های مربوطه استفاده کردند. نتایج حاصله از مطالعه نشان داد این روش از حساسیت و ویژگی بالایی جهت تشخیص برخوردار می‌باشد (۱).

امروزه جهت تایپینگ جدایه‌های این باکتری از روش مولکولی PCR استفاده می‌گردد (۱۰،۱۳). در این تکنیک وجود ژن خاص باکتری بررسی می‌شود. این تکنیک از حساسیت بالایی برخوردار بوده به طوری که قادر به تشخیص مقادیر کم DNA بوده که گاهی در آزمون کشت منفی گزارش می‌شود. از سویی دیگر استفاده از توالی‌های اختصاصی ژنوم اختصاصیت آن را افزایش داده است. از مزایای دیگر این تکنیک زمان کوتاه جهت تشخیص قابل اطمینان می‌باشد. در مطالعه حاضر جهت تأیید تایپینگ از این تکنیک استفاده گردید که نتایج رضایت‌بخشی حاصل شد. Albini و همکاران در سال ۲۰۰۸ PCR را به عنوان تکنیکی قابل اطمینان جهت تشخیص گزارش کردند (۲). Gurjar و همکاران در سال ۲۰۰۸ جهت جداسازی سریع و تایپینگ از Real-time multiplex PCR گاوهای شیری استفاده کردند (۱۹). در ایران در زمینه MLD *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B به روش خنثی سازی در موش آزمایشگاهی اطلاعات چندانی موجود نمی‌باشد. در بررسی Ardehali و همکاران در سال ۱۹۹۴ در زمینه جداسازی *کلستریدیوم پرفرینجنز* از خاک مراتع کرج هیچ موردی از *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B جداسازی نگردید. از سوی دیگر *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D ایزوله شده از MLD پایینی نسبت به سویه‌های رفرنس برخوردار بود (۶). Nillo در سال ۱۹۶۳ بررسی در زمینه MLD *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C انجام داد. نتیجه مطالعه محدوده‌ای از رقت ۱/۵۰۰ تا ۱/۱۵۰۰ بود. البته در ادامه اشاره نمود که بعضی از جدایه‌ها ممکن است میزان پایینی از توکسین را ترشح نمایند (۲۸). در مطالعه Ardehali و همکاران در سال ۱۹۹۴ بر روی *کلستریدیوم پرفرینجنز* ایزوله شده نیز این نتیجه مشاهده گردید (۶) در این مطالعه محدوده MLD برای جدایه‌ها از رقت کمتر از ۱/۱۰ تا ۱/۹۰۰ بود که با نتیجه Nillo و Ardehali مطابقت داشت (۶،۲۸). در این مطالعه نتایج سرم نوترالیزاسیون واکسن آزمایشی سویه رفرنس رضایت‌بخش و با استاندارد بین المللی مطابقت داشت (۱۴). در بررسی‌های دیگر نتایج مطالعات سرم نوترالیزاسیون بر روی واکسن نوترکیب حاوی ژن‌های اپسیلون و بتا در *E.coli* (۲۹) و بر روی واکسن بتا توکسوئید نوترکیب در *E.coli* تیتر آنتی‌توکسین بتا خرگوش را ۱۰ واحد بین الملل در هر میلی‌لیتر تعیین نمود (۲۵) که با سویه رفرنس این مطالعه مطابقت داشت. در مطالعه Salvarani در سال ۲۰۱۳ نتایج مطالعات سرم نوترالیزاسیون بر روی واکسن نوترکیب دو ظرفیتی حاوی توکسوئیدهای آلفا و بتا ۲۰ واحد بین الملل در هر میلی‌لیتر تعیین

شد (۳۰) که تیتر آن بالاتر از مطالعات فوق الذکر بود. در مطالعه Das در سال ۲۰۱۶ بر روی واکسن دو ظرفیتی بتا و یوتا ایمن سازی در موش‌ها با توکسین‌های بتا و یوتا مناسب بوده و قدرت خنثی‌سازی سموم فوق در هر دو شرایط درون و برون‌تنی را داشت (۹).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جدایه ۱۷۹۵ با قدرت توکسین‌زایی بالا، امکان استفاده در تولید واکسن دارد. البته این مسئله نیازمند تحقیقات بیشتر است. همچنین سویه رفرنس از قدرت ایمن‌زایی بالایی برخوردار بود که با استاندارد بین المللی مطابقت داشت.

سپاسگزاری

نویسندگان از پرسنل بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی‌هوازی که در مراحل مختلف پروژه همکاری نموده‌اند تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Al-Khaldi, S., Myers, K., Rasooly, A., Chizhikov, V. (2004). Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. Mol Cell Probes, 18, 359-367. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.05.006 PMID: 15488374
2. Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschläger, 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. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.024 PMID: 17855025
3. Ardehali, M. (1967). Some observations on *Clostridium perfringens* strains isolated in Iran. Arch Razi Inst, 21, 60-66. https://doi.org/ 10.22092/ARI.1969.108662
4. Ardehali, M., Darakhshan, H., Moosawi, M. (1984). The existence and present situation of clostridial diseases of domestic animals in Iran. Arch Razi Inst, 34, 27-32. https://doi.org/10.22092/ARI.1984.108937
5. 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. https://doi.org/10.22092/ARI.1988.108963
6. 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. https://doi.org/10.22092/ARI.1994.109137
7. Aschfalk, A., Younan, M., Drochner, W., Muller, W. (2002). The distribution and frequency of *Clostridium perfringens* toxinotypes in healthy sheep in Benin, West Africa. Trop Anim Health Pro, 34, 289-293. https://doi.org/10.1023/a:1015678617853 PMID: 12166330
8. Bhown, A. S., Habeeb, A. (1977). Structural studies on ε-prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to ε-toxin. Biochem Biophys Res Commun, 78, 889-896. https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90506-X
9. Das, S., Majumder, S., Kingston, J. J., Batra, H. V. (2016) Generation and characterization of recombinant bivalent fusion protein r-Cpib for immunotherapy against *Clostridium perfringens* beta and iota toxemia. *Molecular* Mol. Immunol, 70, 140-148. http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.12.001.Epub2016Jan7
10. Deprez, P. (2015). *Clostridium perfringens* infections–a diagnostic challenge. Vet Record, 177, 388-389. http://dx.doi.org/10.1136/vr.h5428
11. Smith, DS. (1984). The Pathogenic Anaerobic Bacteria. *Clostridium perfringens*. (3 rd ed.) Charles Thomas Publisher Ltd. Springfield, USA. p. 101-114.
12. El-sify, A. (2015). A review on *Clostridium perfringens* toxins with special reference to Beta 2 toxin. J Curr Vet Res, 9, 85-100. https://doi.org/10.21608/JCVR.2015.37191
13. 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. Afr J Microbiol Res, 10, 725-732. http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.8023
14. European Pharmacopoeia. (2017). *Clostridium perfringens* Vaccines for Veterinary Use. (9th ed.) European Pharmacopoeia Publisher. Amazon. p. 363.
15. Fleming, S. (1985). Enterotoxemia in neonatal calves. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1, 509-514. http://dx.doi.org/10.1016/s0749-0720(15)31299-8 PMID: 3907784
16. Frank, F. (1956). *Clostridium perfringens* type B from enterotoxemia in young ruminants. Am J Vet Res, 17, 492-494. PMID: 13340113
17. Garmory, H., Chanter, N., French, N., Bueschel, D., Songer, J., Titball, R. (2000). Occurrence of *Clostridium perfringens* beta 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol Infect, 124, 61-67. http://dx.doi.org/10.1017/s0950268899003295 PMID: 10722131
18. Ghazi, F., Younan, M., Ardehalli, M., Müller, W. (1997). Differentiation of proteinase (minor toxin lambda) in *Clostridium perfringens* strains from sheep and goats in Iran. Deut tierarztl Woch, 104, 443-445. PMID: 9394541.
19. Gurjar, A., Hegde, N., Love, B., Jayarao, B.M. (2008). Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. Mol Cell Probe, 22, 90-95. http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2007.08.001 PMID: 17890052
20. Hadimli, H.H., Erganiş, 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, 409-415. http://dx.doi.org/10.3906/vet-1008-437
21. Hunter, S., Brown, J., Oyston, P., Skurai, J., Titball, R. (1993). Molecular genetic analysis sequence homology with alpha-toxin,

gama-toxin and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 61, 3958-3965. https://doi.org/10.1128/IAI.61.9.3958-3965.1993 PMID: 8359918

22. Hunter, S., Clarke, I., Kelly, D., Titball, R. (1992). Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. Infect immun, 60, 102-110. https://doi.org/10.1128/IAI.60.1.102-110.1992 PMID: 1729175
23. MacFaddin, J. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. Int J Syst Evol, 31, 108. https://doi.org/10.1099/00207713-31-1-108
24. Songer, J.G., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Petridou, E., Minas, A., Taylor, D.J., Delmée, M. (2006). Clostridial abomasitis. In: Genus *Clostridium*-Clostridia in Medical, Veterinary and Food Microbiology: Diagnosis and Typing. Control of Infectious Diseases, European Communities. Mainil, J Luxembourg, German. p. 44-77.
25. Milach, A., de los Santos, J.R., Turnes, C.G., Moreira, A.N., de Assis, R.A., Salvarani, F.M., Lobato, F.C.F., Conceição, F.R. (2012). Production and characterization of *Clostridium perfringens* recombinant β toxoid. Anaerobe, 18, 363-365. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.01.004
26. Miyata, S., Matsushita, O., Minami, J., Katayama, S., Shimamoto, S., Okabe, A. (2001). Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* ε-toxin in the synaptosomal membrane. J Biol Cemh, 276, 13778-13783. https://doi.org/10.1074/jbc.M011527200
27. Moosawi, M., Ardehali, M., Pilehchian, R. (1994). Preparation of standard *Clostridium perfringens* antitoxin in the sheep. Arch. Inst Razi, 44/45, 101-105. https://doi.org/10.22092/ARI.1994.109139
28. Niilo, L., Moffatt, R.E., Avery, R.J. (1963). Bovine "Enterotoxemia". II. Experimental reproduction of the disease. Can Vet J, 4, 288-298. PMID: 17421646
29. Pilehchian Langroudi, R., Aghaei Pour, K., Shamsara, M., Jabbari, A.R., Habibi, G.R., Goudarzi, H., Ghorashi, S.A. (2011). Fusion of *Clostridium perfringens* type D and B epsilon and beta toxin genes and it's cloning in *E. coli*. Arch Razi Inst, 66, 1-10. https://doi.org/10.22092/ARI.2016.103859
30. Salvarani, F.M., Conceição, F.R., Cunha, C.E., Moreira, G.M., Pires, P.S., Silva, R.O., Alves, G.G., Lobato, F.C. (2013). Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids α and β promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. Vaccine, 31, 4152-4155. http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.094
31. Sayeed, S., Li, J., McClane, B.A. (2010). Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. Infect Immun, 78, 495-504. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00838-09
32. Songer, J.G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin Microbiol Rev, 9, 216-234. https://doi.org/10.1128/CMR.9.2.216 PMID: 8964036
33. Sterne, M., Batty. (1973). Pathogenic Clostridia Typing of *Clostridium perfringens*: Butterworth, London. p. 79-82.
34. 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. http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00547-08 PMID: 18625730

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 2, 2021
Original Article

Molecular and Toxigenic Characteristics of *Clostridium Perfringens* Type B Isolates from Sheep and Lamb

Lida Abdolmohammadi Khiav, Alireza Paradise

Department of Anaerobic Vaccine Research and Production, Specialized Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

10.22059/jvr.2020.296158.3015

Received: *24 January 2021,* ***Accepted:*** *11 April 2021*

Abstract

BACKGROUND: *Clostridium perfringens* is an important animal pathogen that causes severe loses to the livestock and poultry industries. Therefore, bacterial detection is believed to be of particular importance.

OBJECTIVES: The present study aimed to identify Iranian isolates using conventional and molecular methods and to evaluate their toxicity.

METHODS: In this work, 23 *Clostridium perfringens* type B isolates were examined via microbiological and biochemical tests. Subsequently, they were subjected to PCR technique for the final confirmation. After culturing of the isolates in specific medium, the minimum lethal dose test was performed. The most toxigenic isolate and reference strain was prepared the enterotoxaemia anaculture vaccine. Serum neutralization test was performed on the experimental inactive vaccines.

RESULTS: The results revealed that *etx* and *cpb* gene could be found in all of the isolates, yet *cpb*2 gene was found in 65.2 % of the isolates. The minimum lethal dose ranges for these bacteria was less than 1/10 to more than 1/900. The results of serum neutralization in Iranian isolate and reference strains were 5 and 10 IU / ml, respectively.

CONCLUSIONS: The findings herein implied that strain 1795 with high toxicity could be used in vaccine production. Of course, for use in production, further research on target animals is needed.

Keywords: *Clostridium perfringens*, PCR, Minimum lethal dose, Serum neutralization, Antitoxin standard

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mohammadimail1396@gmail.com Tel/Fax: 263-457 0038/263-455 2194

How to cite this article:

Abdolmohammadi Khiav, L., Paradise, A. (2021). Molecular and Toxigenic Characteristics of *Clostridium Perfringens* Type B Isolates from Sheep and Lamb. J Vet Res, 76(2), 268-276. https://doi.org/10.22059/jvr.2020.296158.3015

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Information of *Clostridium perfringens* type B isolates
Table 2. Oligonucleotide primer sequences, name of the gene, and the length of amplification products
Figure 1. PCR amplification of 566 base pair fragment Epsilon toxins.
Figure 2. PCR amplification of 196 base pair fragment beta toxins.
Figure 3. PCR amplification of 567 base pair fragment beta2 toxins.