JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۱: ۱۰-۱

مقاله پژوهشی

بررسی آلودگی کبدهای گوسفند و گاو کشتار شده در کشتارگاه های استان البرز به *کلستریدیوم نوای* به روش های کشت بیوشیمیایی و PCR

علی رضایی کلوانی [۱]، لیدا عبدالمحمدی خیاو [۲*]، علی حق روستا [۳]

۱- کارشناس ارشد بخش بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

۲- دانش‌آموخته دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، مسئول فرمولاسیون واکسن های بی هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

۳- دانش‌آموخته دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۵

چکیده

کلستریدیوم نوای تیپ B عامل بیماری قانقاریای عفونی کبد می باشد. اسپور باکتری همراه غذا وارد بدن شده و از طریق سیستم لنفاوی وارد کبد می شود. به دلیل شرایط هیپوکسیک کبد زمینه برای تبدیل به فرم رویشی و تکثیر باکتری فراهم شده باکتری مقدار زیادی توکسین تولید نموده که در نهایت منجر به مرگ دام می‌شود. بنابراین تشخیص توکسین و جداسازی باکتری از دستگاه گوارش دام به خصوص کبد جهت تشخیص این بیماری استفاده می‌شود. به منظور کنترل بیماری بررسی فراوانی میزان آلودگی ضروری می باشد. هدف از این مطالعه بررسی تعیین شیوع *کلستریدیوم نوای* در کشتارگاه های استان البرز می‌باشد. در این تحقیق تعداد ۳۸۶ نمونه کبد از کشتارگاه ها اخذ و پس از آزمایشات باکتریولوژی (کشت در محیط اختصاصی حاوی خون اسب و محیط کشت اختصاصی مایع ، تست حرکت و رنگ‌آمیزی گرم) و بیوشیمیایی (تخمیر قندها، لیسیتیناز، لیپاز، ژلاتیناز، اندل، هضم شیر و کاتالاز) نمونه ها توسط PCR تأیید نهایی شدند. برای این منظور از پرایمر طراحی شده از توکسین آلفا این باکتری استفاده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که میزان آلودگی به این باکتری در کشتارگاه‌ها ۳۷ مورد (۹/۵٪) بود که ۳۳ مورد (۸۹/۱۸٪) آن آلودگی همزمان به *کلستریدیوم نوای* و فاسیولا داشتند و تنها در ۴ مورد بدون آلودگی به *فاسیولا* این باکتری جداسازی و تشخیص داده شد. با توجه به خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری به صنعت دامپروی لازم است واکسیناسیون به موقع صورت گیرد.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم نوای* تیپ B ، PCR ، تشخیص، توکسین آلفا ، واکسیناسیون

*نویسنده مسئول: لیدا عبدالمحمدی خیاو

آدرس: : بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی‌هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران. تلفن ۳۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶

پست الکترونیک: mohammadimail1396@gmail.com

مقدمه

هرساله تعداد زیادی دام در اثر بیماریهای کلستریدیایی از بین رفته و خسارات مالی جبران ناپذیری را به بار می‌آورند. یکی از جنس‌های مهم این باکتری *کلستریدیوم نوای* (*Clostridium novyi*) یا *کلستریدیوم ادماسین* (*Clostridium oedematiens*) می باشد که براساس توکسین‌ها شامل تیپ های A، B، C و D می‌شود. *کلستریدیوم نوای* تیپ B عامل بیماری قانقاریای عفونی کبد گوسفند است که به آن سیاه مرض نیز می گویند. این بیماری یک توکسمی حاد و کشنده بوده که پراکندگی جهانی دارد. این بیماری خاص گوسفند است ولی تا اندازه ای گاو را هم درگیر می‌نماید. در ایران اولین مورد جداسازی *کلستریدیوم نوای* تیپ B از ضایعات کبدی در سال ۱۹۶۹ گزارش شد. تکنیک جداسازی بر پایه آنتی بادی لیبل شده فلورسنت بود. همچنین از تولید لیسیتیناز، فعالیت همولیتیک و نکروز و کشندگی برای تایپینگ استفاده گردید. در مجموع از ۳۳ جدایه *کلستریدیوم نوای* از سراسر کشور ۲۷ نمونه تیپ B شناسایی گردید. تعدادی از جدایه های شدیدا توکسیک برای تولید واکسن قانقاریای عفونی کبد گوسفند استفاده گردیدند (۱). در سال ۱۹۷۴نمونه دو کبد گوسفند در سیرجان که مشکوک به بیماری فوق بودند به موسسه رازی ارسال و با استفاده از تکنیک آنتی‌سرم لیبل شده فلورسنت و سرم نوترالیزاسیون مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج وجود این باکتری را تائید نمود (۲). در مطالعه دیگری در سال ۱۹۷۵ باکتری *کلستریدیوم نوای* در حیوانات مرده بدون هیچ علامت واضح تشخیص داده شد (۳). مطالعات بیشتر موید عفونت در سراسر کشور برای سال‌های متمادی بود (۴).

این باکتری فاکتورهای ویرولانس متنوعی را تولید می‌نماید. یکی از این عوامل مهم آلفا توکسین می‌باشد که وزن مولکولی در حدود ۲۵۰-۲۰۰ کیلو دالتون دارد. فعالیت آنزیمی توکسین مربوط به بخش ۵۵۱ اسید آمینه ای در N ترمینال بوده که به عنوان حوزه کاتالیتیک شناخته می‌شود (۹). حوزه اتصال به گیرنده درC ترمینال در ناحیه مرکزی برای انتقال توکسین به داخل سیتوزول الزامی می‌باشد (۱۰).

در زمینه میزان شیوع این باکتری در ایران اطلاعات خیلی محدود می باشد، نظر به خسارات اقتصادی صنعت دامپروری ناشی از این بیماری لازم است وضعیت آلودگی به این باکتری در ایران مشخص شود. لذا هدف از این تحقیق بررسی کبدهای گوسفند و گاو کشتار شده در کشتارگاه‌های استان البرز به *کلستریدیوم نوای* به روش های کشت بیوشیمیایی و PCR می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع آوری جدایه ها

در این تحقیق از بهار تا آذر ماه سال ۱۳۹۶ تعداد ۳۸۶ نمونه کبد مشکوک به قانقاریا (ضایعات نکروزه رنگی) از ۸۰ راس گاو و ۳۰۶ راس گوسفند از کشتارگاه های زیاران، راک کرج و دشت بره اخذ و در ظروف و شرایط استریل جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردید.اطلاعات مربوط به نمونه ها در جدول ۱ و نمونه کبد مشکوک به بیماری در شکل ۱ آورده شده است. سپس در زیر هود ایمنی با سوآب استریل از عمق نمونه تکه ای برداشت شد و تست‌های میکروبیولوژی بیوشیمیایی و مولکولی برای جداسازی و شناسایی انجام پذیرفت.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به نمونه های اخذ شده از کشتارگاه های استان البرز

نام کشتارگاه	تعداد کل	جنس		سن (ماه)	تظاهرات بالینی
		نر	ماده		
زیاران	۸۵	۶۱	۲۴	۱۲ >	۱ نمونه با لکه های تیره
راک کرج	۱۲۶	۹۴	۳۲	۲۴>سن>۱۲	۱ نمونه ملتهب با لکه های تیره
دشت بره	۱۷۵	۱۳۸	۳۷	۲۴<	۲ نمونه با لبه های گرد
مجموع	۳۸۶	۲۹۳	۹۳	-	-

شکل ۱. کبد مشکوک به قانقاریای عفونی اخذ شده از کشتارگاه

تهیه محیط های کشت اختصاصی

الف: تهیه محیط کشت مایع جگر

جگر گوسفند را چرخ کرده و به مدت ۴۸ ساعت در فریزر گذاشته سپس آن را جوشانده تا مایع غلیظی حاصل گردد. تکه های جگر را در لوله آزمایش ریخته و به آن از مایع فوق‌الذکر به میزان ۲۵ میلی لیتر اضافه می‌نماییم.

ب: تهیه محیط کشت جامد اختصاصی

محیط کشت شامل میت پپتون عصاره جگر، عصاره مخمر، NaCl ، گلوکز، سیستئین و آگار تهیه و pH آن بر روی ۷/۲ تنظیم گردید. پس از استریل نمودن ویتامین‌ها و عناصر معدنی کمیاب و خون اسب به آن اضافه و در پلیت تقسیم گردید. همچنین محیط کشت اختصاصی حاوی تمام اجزاء بجز آگار و خون به صورت مایع تهیه شد.

کشت نمونه های مشکوک در محیط های فوق‌الذکر

محیط کشت مایع جگر به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده تا شرایط بی هوازی فراهم شود سپس نمونه ها به این محیط کشت تلقیح گردید. همچنین نمونه‌ها در محیط کشت جامد و مایع اختصاصی تلقیح و در شرایط بی‌هوازی به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند تا کلونی و کدورت در محیط کشت ظاهر شوند. سپس به منظور تائید تست‌های بیوشیمیایی تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، لاکتوز، سوکروز، مانیتول و سالیسین تست ژلاتیناز، اندل، لیپاز، هضم شیر (۱۸) ، کاتالاز و لیسیتیناز (۱۹) و تست‌های میکروبیولوژی کشت در محیط بلاد آگار با خون گوسفند، رنگ آمیزی گرم و حرکت انجام گردید.

تست تخمیر قند

شش لوله حاوی ۴/۵ میلی لیتر از محیط های کشت پایه قندی به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از هریک از قندهای گلوکز ٪۱۰، مالتوز ٪۱۰، لاکتوز ٪۱۰، سوکروز ٪۱۰، مانیتول ٪۱۰ و سالیسین ٪۱۰ در هر لوله اضافه شده و از سوسپانسیون باکتری دو قطره تلقیح گردید. لوله ها در شرایط

بی هوازی برای ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. سپس به محیط‌های کشت رنگ برموتیمول بلو افزوده شد. در صورت تغییر رنگ به زرد تست تخمیر قند مثبت و در صورت سبز شدن منفی گزارش گردید (۱۸).

تست ژلاتیناز

لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط ژلاتیناز به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. سپس از سوسپانسیون باکتری دو قطره به آن تلقیح گردید. لوله ها در شرایط بی‌هوازی برای ۴۸ ساعت نگه داری شد. برای قرائت نتیجه تست ژلاتیناز محیط کشت ژلاتین را به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده اگر پس از زمان ذکر شده محتویات لوله حالت مایع داشته باشند تست ژلاتیناز مثبت و در غیر اینصورت منفی گزارش شد (۱۸).

تست اندول و حرکت

یک کلونی از باکتری توسط آنس برداشته و در لوله‌ی حاوی محیط کشت Sulphide Indole Motility (SIM) به صورت خط مستقیم تلقیح گردید. لوله در دمای ۳۷ درجه و شرایط بی‌هوازی برای ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. برای قرائت نتیجه تست اندل چند قطره معرف کواکس در سطح محیط کشت SIM ریخته شد. در صورت ایجاد رنگ قرمز تست اندل مثبت و در صورت ایجاد رنگ زرد منفی گزارش شد (۱۸). در صورت متحرک بودن باکتری کدورت در تمام محیط کشت ایجاد شده و در غیر این صورت، کدورت فقط در اطراف محل تلقیح باکتری مشاهده می‌گردد.

تست لیسیتیناز و لیپاز

توسط پیپت یک قطره از سوسپانسیون باکتری برداشته و در پلیت حاوی محیط کشت egg yolk agar تلقیح گردید. سپس توسط لوپ به صورت استریک در محیط کشت پخش نموده و پلیت در دمای ۳۷ درجه و شرایط بی‌هوازی برای ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. در صورت مشاهده کدورت شیری رنگ اطراف کلونی‌ها تست لیسیتیناز مثبت و در غیر این صورت منفی گزارش شد (۱۹). در مورد قرائت تست لیپاز بر روی این محیط کشت، در صورت وجود هاله شفاف در اطراف کلونی باکتری تست مثبت و در غیر این صورت منفی گزارش شد (۱۸).

تست هضم شیر

لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط لیتموس میلک به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. سپس از سوسپانسیون باکتری تلقیح گردید. لوله در شرایط بی‌هوازی برای ۴۸ ساعت نگه‌داری شد. در صورت شفاف شدن محیط کشت در اثر هضم، ایجاد لخته و وجود گاز، تست هضم شیر مثبت گزارش شد (۱۸).

تست کاتالاز

یک کلونی باکتری توسط آنس بر روی سطح اسلاید گذاشته شد. سپس یک قطره آب اکسیژنه ٪۳ روی آن اضافه گردید. در صورت مثبت بودن تست، حباب در سطح اسلاید مشاهده گردید (۱۹).

سپس آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به منظور تایید نهایی بر روی جدایه‌ها انجام گرفت .

تخلیص DNA

نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد سانتریفوژ نموده سپس مایع رویی تخلیه شد . رسوب با آب دو بار تقطیر شستشو داده شد. مجددا در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و دوباره رسوب با آب دو بار تقطیر شستشو داده شد. سپس سانتریفوژ در همان دور و نهایتا بر روی رسوب، PCR بافر 1X ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد . میکروتیوب حاوی نمونه به مدت ۵ دقیقه در دور

۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده و از سوپرناتانت برای PCR استفاده گردید.

آزمون PCR برای تعیین هویت توکسین آلفا

برای PCR، ۰/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ Mm)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ Mm)، ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA پلی‌مراز(۵U/ µl)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت (۱۰ پیکو مول در میکرولیتر) (سیناژن)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت (۱۰ پیکو مول در میکرولیتر) (سیناژن) و آب دو بار تقطیر اضافه نموده تا حجم نهایی مخلوط واکنش به ۲۴/۵ میکرولیتر برسد. پرایمرهای PCR در جدول ۲ آورده شده که از ژن آلفا توکسین (*tcnα*) Accession number: (Z48636.1) گرفته و طراحی شد.در کنترل مثبت از سویه رفرانس *کلستریدیوم نوای* CN 804 و در کنترل منفی بجای DNA الگو آب دو بار تقطیر ریخته و در کنترل منفی دوم از *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D استفاده شد. سپس نمونه در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت تا PCR انجام شود. برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۳ دقیقه در ۶۸ درجه سانتی‌گراد و متعاقب آن گسترش برای ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. سپس محصول PCR با لودینگ بافر مخلوط و درون چاهک‌های ژل آگاروز ۱٪ ریخته شد و پس از الکتروفورز با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی گردید در نهایت توسط دستگاه ژل داک عکس برداری شد.

جدول شماره ۲. توالی پرایمرهای اولیگونوکلئوتید استفاده شده جهت تشخیص آلفا توکسین

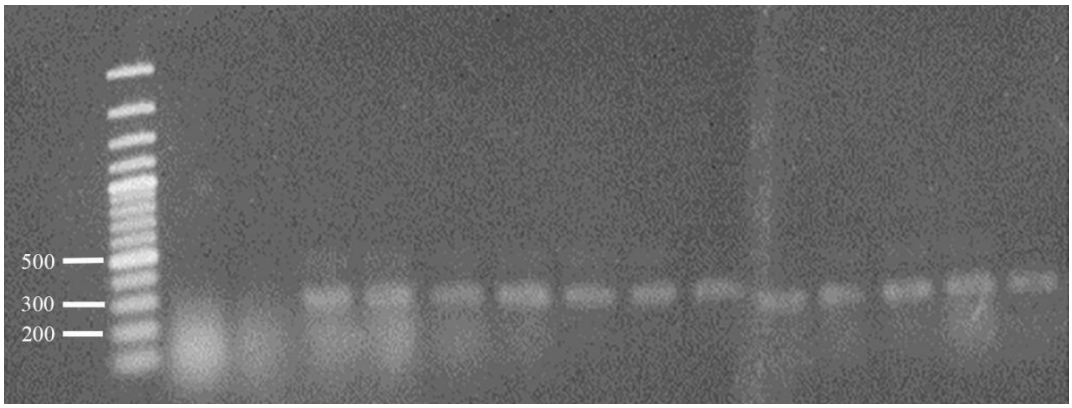
منبع	توالی نوکلئوتیدی	پرایمر	نام ژن
(۱۱)	CGCTCCTAGCAGTCCCGAAAT	CnR	*tcnα*
(۱۱)	GGTGCGATTCAAGAGGCCACA	CnF	*tcnα*

نتایج

در بررسی ۳۸۶ نمونه کبد در ۳۷ مورد (۹/۵٪) *کلستریدیوم نوای* جداسازی و تشخیص داده شد که ۳۳ مورد (۸۹/۱۸٪) آن آلودگی همزمان به *کلستریدیوم نوای* و *فاسیولا* (*Fasciola*) داشتند و تنها در ۴ مورد بدون آلودگی به *فاسیولا* این باکتری جداسازی و تشخیص داده شد . در تمامی موارد (بجز ۱ مورد در گاو) عامل بیماری از گوسفند جداسازی گردید.

جدایه ها قادر به تخمیر قندهای گلوکز و مالتوز بودند. ولی توانایی تخمیر قندهای لاکتوز، سوکروز، سالیسین و مانیتول را نداشتند. همگی ژلاتیناز، لیسیتیناز و حرکت مثبت بودند ولی اندل، لیپاز، کاتالاز و هضم شیر منفی بودند. تمامی جدایه ها بر روی محیط کشت حاوی خون گوسفند فعالیت همولیتیک داشته و در محیط کشت اختصاصی خون اسب رشد مناسبی داشتند (شکل ۲). در رنگ‌آمیزی گرم جدایه‌ها، باسیل گرم مثبت مشاهده شد. در آزمون PCR همه جدایه‌های تحت آزمون، قطعه ای به طول ۲۶۱ bp مربوط به آلفا توکسین تکثیر نمودند و بدین ترتیب تعلق همه آنها به *کلستریدیوم نوای* آشکار گردید.

شکل ۲ . کلونی های *کلستریدیوم نوای* در محیط کشت اختصاصی خون اسب



شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR در نمونه های مشکوک به قانقاریا

ستون ۱ مارکر ۱۰۰ bp ، ستون ۲ کنترل منفی (آب دو بار تقطیر)، ستون ۳ کنترل منفی (DNA *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D)، ستون ۴ الی ۱۳ نمونه‌ها و ستون ۱۵ کنترل مثبت (سویه رفرانس *کلستریدیوم نوای*).

بحث و نتیجه‌گیری

قانقاریای عفونی کبد گوسفند و بز سالیان مدیدی است که در ایران وجود داشته و تاکنون جدایه‌های زیادی از کبد دام‌های آلوده بررسی و مورد مطالعه قرار گرفته است. اردهالی و همکاران در سال ۱۹۸۸ تایپینگ ۳۰۷ نمونه از دام‌های آلوده به عفونت‌های کلستریدیایی به روش آنتی‌سرم اختصاصی لیبل شده فلورسنت را انجام دادند. در مجموع از ۳۰۷ نمونه ۵۱ نمونه آلوده به *کلستریدیوم نوای* از گوسفند، گاو و بز جداسازی و شناسایی شد (۵).

اردهالی و همکاران در سال ۱۹۸۹ جدایه‌ها را از کبد دام‌های مبتلا که از دامداری‌های کرج، اصفهان، حیدرآباد، سیرجان، طالقان، قزوین، چالوس، بروجرد و زنجان اخذ و به موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی ارسال شده بودند جدا کرده و مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آزمایشات نشان داد که از این تعداد ۴۴ جدایه مربوط به *کلستریدیوم نوای* تیپ B، ۴ جدایه متعلق به *کلستریدیوم نوای* تیپ A و ۳ جدایه *کلستریدیوم نوای* تیپ D بود. *کلستریدیوم نوای* تیپ B عامل اصلی قانقاریای کبد می‌باشد. هرچند *کلستریدیوم نوای* تیپ D ندرتا از موارد نکروز کبد گوسفند جداسازی

گردید. اردهالی و همکاران توکسین‌زایی جدایه‌ها را مورد بررسی قرار دادند. نتایج بررسی نشان داد *کلستریدیوم نوای* تیپ B ۵۰۰-۱۳۰۰۰ MLD/ml (حداقل دز کشنده در هر میلی‌لیتر) و *کلستریدیوم نوای* تیپ A ۱۰۰-۱۲۰۰۰ MLD/ml ایجاد می‌نماید و *کلستریدیوم نوای* تیپ D هیچ توکسینی تولید نکرد. نتایج این بررسی اهمیت وجود *کلستریدیوم نوای* تیپ B را در ایجاد بیماری اثبات می‌نماید (۶).

در سال های ۱۹۹۰-۱۹۹۲، سی و هشت نمونه مشکوک به ادم بدخیم گاو شامل ماهیچه، استخوان و خون از قسمت‌های مختلف ایران توسط تکنیک آنتی بادی فلورسنت، فعالیت توکسیسیتیک، پاتوژنیسیته مورد بررسی قرار گرفت از این تعداد ۱ نمونه آلوده به *کلستریدیوم نوای* شناسایی گردید (۱۵).

آزمون‌های متفاوتی برای تشخیص *کلستریدیوم* ها ذکر شده که از جمله آن‌ها می‌توان به آزمون‌های بیوشیمیایی (هیدرولیز لیسیتین، تخمیر قندها، تخمیر طوفانی شیر تورنسل و اندل) اشاره نمود (۱۴). همتی در سال ۲۰۰۶ با استفاده از تکنیک‌های بیوشیمیایی(ژلاتیناز، لیسیتیناز، لیپاز، احیاء نیترات و آمیلاز، اندل و تخمیر قندها) ، تست میکروبیولوژی (حرکت) ، تست آنتی بادی فلورسنت غیر مستقیم و PCR از گوسفندان مشکوک در ناحیه ارومیه ۴ جدایه این باکتری را شناسایی و تعیین هویت نمود (۱۲).

بورمن خنثی سازی با استفاده از کشت سلولی را برای تشخیص آلفا توکسین *کلستریدیوم نوای* مناسب گزارش نمود (۸,۷). همچنین استفاده از PCR، تکنیک رایج جهت تشخیص DNA شده است. دانشمندان تشخیص بر اساس PCR را در مجموعه‌ای از فن آوری‌ها شامل quantitative real-time PCR، Multiplex PCR، isothermal PCR و microfluidic PCR توسعه دادند (۱۳). ساساکی و همکاران در سال ۲۰۰۲ از Multiplex-PCR برای تشخیص سریع *کلستریدیوم نوای* تیپ B استفاده نمودند. ساساکی گزارش نمود سیستم Multiplex-PCR برای شناسایی سریع کلستریدیا مفید می‌باشد (۱۷). در سال ۲۰۱۷ نیوک از PCR برای تشخیص قانقاریای عفونی در اسب استفاده نمود. نتایج بررسی نمونه های کبد آزمایش شده با استفاده از PCR برای ژن های فلاژلین و آلفا توکسین *کلستریدیوم نوای* تیپ B مثبت بود، اما برای *کلستریدیوم همولیتیکوم Clostridium haemolyticum* و سایر کلستریدیاها منفی بود (۱۶). همچنین با توجه به مزایای تکنیک LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) از جمله حساسیت، ویژگی و سرعت برای تشخیص می‌توان استفاده نمود. لیو از روش الکتروشیمیایی مبتنی بر LAMP برای تشخیص این باکتری استفاده نمود(۱۳).

امروزه با توجه به مزایای تکنیک‌های مولکولی از جمله حساسیت، ویژگی، دقت و سرعت استفاده از آن‌ها برای تشخیص در حال افزایش می‌باشد (۲۰).

همچنین با توجه به القاء سیستم ایمنی توسط ژن آلفاتوکسین می‌توان از واکسن‌های نوترکیب با کلون قطعه ایمونوژن آلفا توکسین جهت تحریک ایمنی موثر بر علیه بیماری استفاده نمود. در این زمینه، پژوهشی توسط گردنوشهری بر روی قطعه ای از آلفاتوکسین این باکتری با ایمونوژنیسیته بالا و کلون آن در وکتور بیانی انجام شد، و پروتئین نوترکیب حاصل شده ایمنی بالاتری نسبت به توکسین طبیعی نشان داد (10).

نتیجه گیری قطعی

با توجه به اینکه این بیماری در مناطقی که انگل های کبدی مانند *فاسیولا هپاتیکا* (*Fasciola hepatica*) و *فاسیولا ژیگانتیکا* (*Fasciola gigantica*) شایع است،

بروز می‌نماید لذا علاوه بر واکسیناسیون باید اقدام به درمان دام با داروهای ضد انگل نمود. پیشنهاد می‌شود از تکنیک PCR طراحی شده برای قطعه ژن آلفاتوکسین *کلستریدیوم نوای* جهت تشخیص سریع بیماری مخصوصا در مناطق آلوده به *فاسیولا* مانند نوار شمالی کشور استفاده گردد. همچنین مطالعاتی در زمینه جداسازی سویه های توکسیژنیک و فاکتورهای موثر بر توکسین‌زایی انجام گیرد تا در صورت امکان بتوان به عنوان جایگزین از آن در تولید واکسن استفاده نمود .

منابع

1. Ardehali, M., Darakhshan, H. (1979). Isolation and typing of *Clostridium Oedematiens* (*C. novyi*) from cases of black disease of sheep in Iran. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **2**: 107–111.
2. Ardehali, M., Darakhshan, H. (1977). First report of infection with *Clostridium oedematiens* type D in sheep in Iran. *Archives of Razi Institute*, **29**: 91-93.
3. Ardehali, M., Derakhshan, H. (1975). The first report of *clostridium oedematiens* infection in sheep in Iran by the use of Fluorescent labelled antibody. *Indian Veterinary Journal*, 52: 600.
4. Ardehali, M., Darakhshan, H., Moosawi**,** M**.** (1984). The existence and present situation of clostridial diseases of domestic animais in Iran. *Archives of Razi Institute*, **34**,**35**: 27-32.
5. Ardehali, M., Moosawi, M., Avazpoor, J. (1988). Isolation, typing and rapid diagnosis of pathogenic Clostridia from infected animals in Iran. *Archives of Razi Institute*: **38**,**39**: 35-42.
6. Ardehali, M., Moosawi, M., Pilehchian, R. (1989). Characterization of *Clostridium oedematiens* strains isolated from cases of black disease of sheep in Iran. *Archives of Razi Institute*, **40**: 37-45.
7. Borrmann, E., Schulze, F. (1988). Detection of *Clostridium novyi* type B alpha toxin using cell culture systems. ALTEX, **15**: 53-55.
8. Borrmann, E., Schulze, F. (1999). Detection of *Clostridium novyi* type B alpha toxin by cell culture systems. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **24**: 275-280.
9. Busch, C., Schömig, K., Hofmann, F., Aktories, K. (2000). Characterization of the catalytic domain of *Clostridium novyi* alpha-toxin. *Infection and Immunity*, **68**: 6378-6383.
10. Gord-Nooshahri, N., Fathi Nahafi, M., Makhdoumi, A., Majidi, B., Mehrvarz, M. (2016). Identification and cloning of highly epitopic regions of *Clostridium novyi* alpha toxin. *Turkish Journal of Biology*, **40**: 1219-1226.
11. Heffron, A., Poxton, I.R. (2007). A PCR approach to determine the distribution of toxin genes in closely related *Clostridium* species: *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins and C2 toxin, and *Clostridium novyi* alpha toxin. *Journal* of *Medical Microbiology*, **56:** 196-201.
12. Hemmaty, M., Morshedi, A., Yousofbeigi, A., (2006). Fathi Najafi, M. Isolation and identification of *Clostridium septicum* from sheep-dung. *Archives of Razi Institute*, **61**: 167-172.
13. Liu, L.L., Jiang, D.N., Xiang, G.M., Liu, C., Yu, J.C., Pu, X.Y. (2014). Development of a cyclic voltammetry method for the detection of *Clostridium novyi* in black disease. *Genetics and Molecular Research*. **13**: 1724-1734.
14. Mac Faddin, J.F. (1980). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2th Edition, Lippincott Williams& Wilkins, Baltimore: 572.
15. Moosawi, M., Ardehali, M., Farzan, A., Pilehchian Langroudi, R. (1999). Isolation and Identification of *Clostridium* Strains from Cattle Malig-

nant Edema Cases. *Archives of Razi Institute*, **50**: 65–70.

16. Nyaoke, A.C., Navarro, M.A., Beingesser, J., Uzal, F.A. (2018). Infectious necrotic hepatitis caused by *Clostridium novyi* type B in a horse: case report and review of the literature. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **30**: 294-299.
17. Sasaki, Y., Kojima, A., Aoki, H., Ogikubo, Y., Takikawa, N., Tamura, Y. (2002). Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Veterinary Microbiology*, **1**,**86**: 257-267.
18. Smith, L.D., Holdeman, L.V. (1988). The pathogenic anaerobic bacteria. c.c. Thomas Co., Fort Lauderdale, FL: 109-139.
19. Sterne, M., Batty, I. (1973). Pathogenic Clostridia typing of *Clostridium perfringens*. Butterworth, London: 79-82.
20. Uzal, F.A., Songer, J.G., Prescott, J.F., Popoff, M.R. (2016). Clostridial diseases of animals. Chapter 23. Infectious Necrotic Hepatitis. 1th Edition, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken: 275-279.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 16, Issue 2, 2020

Evaluation of *Clostridium novyi* infection in liver of sheep and cattle slaughtered in the slaughterhouses of Alborz province by culture, biochemical and PCR methods

Ali Rezaee Kalvani [1] , Lida Abdolmohammadi khiav [2*], Ali Hagh Roosta [3]

1- M.Sc, Department anaerobic bacterial vaccine Production and Research, Clostridia Research laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

2- Graduated from Ph.D. Bacteriology, Responsible for the formulation of anaerobic vaccines, Clostridia Research laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3- Graduated from Ph.D. Bacteriology, Department anaerobic bacterial vaccine Production and Research, Clostridia Research laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 20 may 2019 *Accepted: 4 February 2020*

Abstract

Clostridium novyi type B is the causative agent of liver infectious diseases. Bacterial spores enter the body along with food and through the lymph system get into the liver. Due to the hypoxic condition of the liver, bacteria converts to the vegetative form and replicates and produces a large amount of toxin, which ultimately leads to death. Therefore, the detection of toxin and bacterial isolation from animal gastrointestinal contents especially the liver are used to diagnose of disease. In order to control the disease, the frequency of Clostridium novyi isolates from infected animals in Alborz province is essential to be known. The aim of this study was to determine the prevalence of Clostridium novyi in slaughterhouses in Alborz province. In this study, 386 liver samples were collected from the slaughterhouses, then the bacteriological (culture in selective horse blood medium and specific liquid medium, motility test and gram staining) and biochemical tests (fermentation of sugars, lecithinase, lipase, gelatinase, Indol, milk digestion and catalase) were done, and the samples were finally confirmed using PCR. For this purpose, the primers were designed using alpha toxin DNA sequence. Results showed that the infection rate in the slaughterhouses was 37 (9.5%) in which 33 cases (89.18%) had concurrent contamination with Clostridium novyi and only 4 cases without Fasciola infection were detected. Due to the highly economic losses, vaccination is very urgent.

Keywords: Clostridium novyi type B, PCR, Diagnosis, Alpha toxin, Vaccination

**Corresponding author: Lida Abdolmohammadi khiav*

Address: Department anaerobic bacterial vaccine Production and Research, Clostridia Research laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Tel:+982634570038

E. mail: mohammadimail1396@gmail.com