"Case report" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1938475.1318**

Isolation of *Clostridium perfringens* type A from the abomasum of three lambs with abomasitis

Abdollahi, M.[1]*, Abdollahpour, G.R. [2], Ashrafi-Tamai, I.[3], Razmyar, J.[4], Asghari Baghkheirati, A.[5]

1- Post Graduate Student, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Laboratory Expert, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
4- Associate Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
5- Resident, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding author's email: abdollahi.mostafa@ut.ac.ir
(Received: 2021/9/11 Accepted: 2022/1/1)

Abstract

In March 2020, three 5-15 day old mixed breed lambs were referred to the University of Tehran Veterinary Hospital. The farmer complained of 20% mortality rate (42 heads) in 4-17 day old lambs of his flock which were exclusively breastfed. During observation and clinical examination, recumbency, depression, weakness, body temperature of 40°C, abomasal dilation with fluids, tachypnea, tachycardia and hyperemia of the mucosa were recorded. After clinical examination, the lambs were examined by hematology and then necropsied under sterile conditions. In hematologic examination, normocytic-normochromic anemia, leukopenia, lymphopenia, left shift, the presence of schistocytes, keratocytes, myelocytes and metamyelocytes were observed. In necropsy, there were abomasal petechial hemorrhages, coffee grain-like blood masses in the contents of the abomasum and pale kidneys. The direct gram smear from the abomasum had a large number of positive gram rods. Blood, bone marrow, brain, lung, heart, liver, kidney, intestine and abomasum were subjected to aerobic and anaerobic bacterial cultures. *Clostridium perfringens* type A and non-pathogenic *E coli* were isolated from the abomasum and intestine of patients. This study showed that *Clostridium perfringens* type A may be involved in the pathogenesis of abomasitis in lambs.

Conflict of Interest: None declared.
Keywords: Abomasitis, Clostridium, *Clostridium perfringens*, Lamb.

" گزارش موردی"

DOI: 10.30495/JVCP.2022.1938475.1318

جداسازی *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A از شیردان ۳ رأس بره مبتلا به التهاب شیردان (گزارش درمانگاهی)

مصطفی عبداللهی[1*]، غلامرضا عبداله‌پور[2]، ایرج اشرافی‌تمای[3]، جمشید رزمیار[4]، امیر اصغری‌باغخیراتی[5]

۱- دستیار تخصصی گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- استاد گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- کارشناس آزمایشگاه، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

٤- دانشیار گروه بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۵- دستیار تخصصی گروه بیماری‌های پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: abdollahi.mostafa@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱٤۰۰/٦/۲۰ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۱۰/۱۱)

چکیده

در اسفند ماه سال ۱۳۹۸، سه رأس بره ۵ تا ۱۵ روزه نژاد مخلوط به بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع داده شدند. شکایت دامدار از وجود تلفات ۲۰ درصدی (٤۲ رأس) در بره‌های ٤ تا ۱۷ روزه گله خود که تنها با شیر مادر تغذیه می‌شدند، بود. در مشاهده و معاینه بالینی، زمین‌گیری، افسردگی، ضعف، دمای ٤۰ درجه سلسیوس، اتساع شیردان با مایعات، تاکی‌پنه، تاکیکاردی و پرخونی مخاطات ثبت گردید. بره‌ها پس از معاینات بالینی، تحت بررسی خون‌شناسی قرارگرفته و سپس در شرایط بهداشتی کالبدگشایی شدند. همچنین خون، مغز استخوان، مغز، ریه، قلب، کبد، کلیه، روده و شیردان مورد کشت‌های باکتریایی هوازی و بی‌هوازی قرار گرفتند. در بررسی خون‌شناسی، آنمی نرموسیتیک نرموکرومیک، لکوپنی، لنفوپنی، انحراف به چپ، حضور شیستوسیت، کراتوسیت، میلوسیت و متامیلوسیت مشاهده شد. در کالبدگشایی، زخم‌های سرسنجاقی در مخاط شیردان، حضور توده‌های خونی شبیه به دانه قهوه در محتویات شیردان و رنگ‌پریدگی کلیه‌ها وجود داشت. در رنگ‌آمیزی گرم گسترش مستقیم شیردان، تعداد زیادی باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت مشاهده شد. همچنین از شیردان و روده دام‌های بیمار، *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپA و *اشریشیا کولای* غیرپاتوژن جدا گردید. مطالعه حاضر نشان داد که باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپA ممکن است در بیماری التهاب شیردان بره‌ها دخیل باشد.

کلیدواژه‌ها: التهاب شیردان، بره، *کلستریدیوم پرفرینجنس*.

مقدمه

در طب بره و بزغاله، بیماری‌های شیردان در مجموعه کشنده‌ترین بیماری‌ها قرار دارند و دو سندروم التهاب و نفخ شیردان از جمله تظاهرات متداول در کالبدکشایی بره‌ها و بزغاله‌ها هستند (Abdollahi *et al.*, 2019). زخم، اروزیون و نکروز مخاط شیردان سه ضایعه‌ای هستند که در کالبدگشایی، شاخص التهاب شیردان می‌باشند (Vatn and Ulvund, 2000). التهاب شیردان در گوسفند و بز به ۸ نوع تغذیه‌ای (همچون پیکا)، شیمیایی (همچون مسمومیت با فرمالین)، مکانیکی (همچون توپی مویی در شیردان)، باکتریایی (ناشی از *کلستریدیوم سوردلی*)، ویروسی (بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک، عفونت هرپس ویروسی نشخوارکنندگان کوچک، بیماری زبان آبی)، قارچی (ناشی از آبسیدیا)، انگلی (ناشی از همونکوس) و با منشأ نامشخص (بیماری شیردان بزاقی) تقسیم می‌گردد (Christodoulopoulos *et al.*, 2013; Smith, 2014).

فقدان وجود یک رهیافت تشخیصی مناسب در مواجهه با بیماری‌های شیردان می‌تواند سبب شکست در فرایندهای تشخیص، کنترل و درمان در جمعیت بالایی از بره‌ها و بزغاله‌های یک گله گردد (Lotfollahzadeh *et al.*, 2020). پرواضح است که در کشوری همچون ایران که یکی از غنی‌ترین منابع پرورش نشخوارکنندگان کوچک است (Abdollahi *et al.*, 2019)، بایستی مطالعات بیشتری در زمینه ضایعات و بیماری‌های شیردان بره‌ها و بزغاله‌ها صورت پذیرد. باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* دارای ۵ تیپ A، B، C، D و E می‌باشد که این تیپ‌بندی بر اساس توانایی تولید ٤ نوع توکسین آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا صورت می‌گیرد. *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A یک باکتری ساکن طبیعی روده نشخوارکنندگان می‌باشد که دارای توانایی تولید توکسین آلفا و فاقد توانایی تولید ۳ توکسین دیگر است (Songer and Miskimins, 2005). برخی محققان اعتقاد دارند که در زمینه نقش پاتوژنیک *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A به مطالعات بیشتری نیاز است و هنوز توجه کافی به عملکرد احتمالی توکسین آلفا در شیردان و روده نشده است (Timoney *et al.*, 1988). علاوه بر این، نظر براین‌که تا به امروز توانایی تولید ۱۷ نوع توکسین توسط تیپ‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* به اثبات رسیده، ممکن است که در هر تیپ، وجود توانایی احتمالی در تولید ۱۳ نوع توکسین دیگر، سبب تنوع در روند بیماری‌زایی و ضایعات ناشی از تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* گردد (Poursoltani *et al.*, 2014). همچنین این احتمال وجود دارد که توانایی در تولید سایر فاکتورهای حدت بالقوه در سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* با سندروم‌های خاصی که ایدیوپاتیک در نظر گرفته می‌شوند، مرتبط باشد (Briggsa *et al.*, 2011). تا به امروز بیماری‌زایی ناشی از سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A را به عملکرد همولیتیک توکسین آلفا در گردش خون نسبت داده‌اند. توکسین آلفا از طریق ایجاد همولیز داخل عروقی و آسیب مویرگی سبب التهاب، تجمع پلاکتی، شوک و تأثیرات قلبی و گاه کشنده می‌شود و بیماری معروف گزارش شده ناشی از این روند بیماری‌زایی، بیماری بره زرد (yellow lamb disease) نام دارد (Smith, 2014). توکسین آلفا گاهی اوقات در محتویات روده حیوانات مبتلا به بیماری روده مشاهده می‌شود و

یک عامل مهم در پاتوژنز میونکروز است. اطلاعات کمی درخصوص افزایش نشت‌پذیری عروق روده در اثر توکسین آلفا وجود دارد ولی این فرضیه عنوان شده است که در موارد ابتلا به انتروتوکسمی، این اثر یک عامل حدت مهم می‌باشد (Smith, 2014). لازم به ذکر است که سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ‌های B تا E با تولید توکسین‌های بتا، اپسیلون و یوتا شناخته می‌شوند ولی سویه‌های تیپ A فاقد توانایی تولید این ۳ توکسین هستند (Roeder *et al*., 1988).

گزارش درمانگاهی حاضر، به جداسازی *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A از شیردان ۳ رأس بره ۵ تا ۱۵ روزه مبتلا به التهاب شیردان پرداخته است.

شرح درمانگاهی

-**تاریخچه**: در اسفند ماه سال ۱۳۹۸، ۳ رأس بره ۵ تا ۱۵ روزه نژاد مخلوط از یک گله گوسفند واقع در استان سمنان با شکایت دامدار از تلفات ۲۰ درصدی (۴۲ رأس) در بره‌های ٤ تا ۱۷ روزه گله‌اش، که تنها با شیرمادر تغذیه می‌شدند، به بیمارستان دامپزشکی دانشگاه تهران واقع در محمد شهر کرج ارجاع داده شدند.

-**معاینات بالینی**: در مشاهده و معاینه بالینی بره‌ها، ایستادن با پشت کمانی (شکل ۱)، گوشه‌گیری، زمین‌گیری، افسردگی، ضعف، دمای بدن در محدوده ٤۰ درجه سلسیوس، اتساع شیردان با مایعات، تاکی‌پنه، تاکیکاردی و پرخون بودن مخاطات ثبت گردید.

شکل ۱- ایستادن بره مبتلا به التهاب شیردان با پشت کمانی

-**آزمایشات تشخیصی**: پس از معاینه بالینی، هر ۳ رأس بره در شرایط استریل کالبدگشایی شدند (Jahed-Dashliboron and Hassanpour, 2013; Khodadad *et al*., 2018; Abdollahi *et al*., 2019). پس از کالبدگشایی و بررسی ماکروسکوپیک، خون، مغز اُستخوان، مغز، ریه، قلب، کبد، کلیه، روده، شیردان مورد کشت باکتریایی هوازی و بی‌هوازی قرار گرفتند. در ادامه هم، باکتری‌های جدا شده، به وسیله آزمایشات

مولکولی لازم، بررسی گردیدند (Chapman *et al.*, 2006; Ahsani *et al.*, 2011).

-**کشت باکتریایی**: برای جداسازی باکتری *اشریشیا کولای*، سواب تماس داده‌شده با عضو مورد نمونه‌برداری، مستقیماً در لوله محیط کشت TSB (Triptic Soy Broth) (مرک، آلمان) قرار گرفت. پس از انتقال لوله‌های مذکور به آزمایشگاه، سواب اخذ شده، به صورت خطی برروی محیط کشت مک‌کانکی آگار (مرک، آلمان) کشت داده شده و به مدت ۲٤ ساعته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری گردید. در ادامه هویت نهائی پرگنه‌های صورتی رنگ (لاکتوز مثبت) تشکیل‌شده بر روی محیط مک‌کانکی آگار، با استفاده از محیط‌های کشت افتراقی لازم از قبیل: TSI agar، اوره آگار، SIM، متیل‌رد- وژس پروسکوئر، سیمون سیترات آگار و EMB agar (به منظور مشاهده جلای فلزی) (همگی مرک، آلمان) تشخیص داده شدند (Mohammadzadeh *et al.*, 2017).

همچنین برای جداسازی باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* مقدار ۱ گرم از عضو مورد نظر برای کشت، به محیط کشت گوشت پخته (مرک، آلمان) اضافه گردیده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری می‌شد. سپس محیط‌های مذکور، از لحاظ رشد (کدورت و تولید گاز) مورد بررسی قرار می‌گرفتند. در ادامه از محتویات لوله‌های دارای رشد، کشت خطی در سطح محیط جامد سولفیت پلی‌میکسین سولفادیازین (مرک، آلمان) صورت گرفته و به مدت ۲٤ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، گرم‌خانه گذاری می‌شدند. کلنی‌های رشد کرده در سطح محیط سولفیت پلی‌میکسین سولفادیازین (مرک، آلمان) دیگری خالص‌سازی شدند. سپس کلنی‌های سیاه رنگ تشکیل شده در سطح محیط مذکور (مشکوک به *کلستریدیوم پرفرینجنس*)، در محیط مایع سولفیت پلی‌میکسین سولفادیازین (مرک، آلمان) به صورت جداگانه تلقیح شده و تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. در مرحله بعد، ۵ قطره از محتویات محیط یاد شده به محیط کشت مایع لاکتوز سولفید (مرک، آلمان) تلقیح شده و گرمخانه‌گذاری تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت انجام گرفت. سپس محیط فوق از لحاظ تولید گاز و رنگ سیاه مورد بررسی قرار گرفت. نهایتاً با استفاده از لوپ سوزنی از محیط لاکتوز سولفید در محیط‌های کشت سولفید ایندول موتیلیتی (مرک، آلمان) و مایع نیترات (مرک، آلمان) تلقیح صورت گرفته و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد (Kheirkhah and Hatam-Jahromi, 2016).

- ***تعیین تیپ جدایه‌های کلستریدیوم پرفرینجنس***: به منظور شناسایی تیپ *کلستریدیوم پرفرینجنس*‌های جداشده در مرحله کشت باکتریائی، از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (multiplex PCR) استفاده شد. بدین منظور یک کلنی خالص از جدایه مذکور را با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر، در داخل یک میکروتیوب حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای جوش قرار دادیم که با اینکار، سلول باکتری کشته شده و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در شتاب ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، محتوای سیتوپلاسمی آن در پائین میکروتیوب ته نشین شده، اما DNA باکتری در مایع رویی باقی ماند

که از آن به عنوان DNA الگو برای انجام Multiplex PCR استفاده شد. همچنین، از ٤ جفت پرایمر برای تشخیص حضور ژن‌های *cpa*، *cpb*، *etx* و *cpe* به ترتیب با هدف شناسایی ژن‌های توکسین آلفا، بتا، اپسیلون و انتروتوکسین، به منظور تعیین تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* استفاده شد (Yadegar *et al.*, 2018) که مشخصات مربوط به آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده به منظور شناسایی تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*

ژن هدف	توالی پرایمر (3′→5′)	اندازه محصول PCR (جفت باز)
cpa	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	۳۲٤
cpb	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	۱۹٦
cpe	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	۲۳۳
etx	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	٦٥٥

واکنش multiplex PCR مورد نظر نیز، در حجم ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (SensoQuest, Goettingen, Germany) با شرایط دمایی ذکر شده در جدول ۲ انجام شد. برای انجام واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر، از ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix RED kit (Ampliqon, Odense, Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر فوروارد و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر ریورس، ۵ میکرولیتر DNA استخراج‌شده از نمونه و مابقی (تا حجم ۲۵ میکرولیتر) از آب مقطر مخصوص PCR استفاده شد. در نهایت هم محصولات واکنش در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۵ درصد، حاوی رنگ ایمن (safe stain) ریخته شده و پس از اتمام الکتروفورز، باندهای مربوطه با استفاده از دستگاه ژل داک (Padideh Nojen Pars, Iran) مشاهده شدند. لازم به ذکر است که در این واکنش از ۲ کنترل مثبت استفاده شد که کنترل مثبت اول (C+1) حاوی ژن‌های *cpa* و *cpe* و کنترل مثبت دوم (C+2) حاوی هر چهار ژن *cpa*، *cpb*، *etx* و *cpe* بود.

جدول ۲- شرایط دمایی مورد استفاده در برنامه PCR به منظور شناسایی تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس*

مراحل PCR		دما (سلسیوس)	زمان (دقیقه)
واسرشت اولیه		۹٥	۳
۳۵ چرخه اصلی شامل	دناتوراسیون	۹٤	۱
	اتصال	٥٥	۱
	گسترش	۷۲	۱
گسترش نهایی		۷۲	۱۰

-انجام PCR جهت بررسی حضور ژن‌های حدت در جدایه‌های *اشریشیا کولای*: بدین منظور ابتدا استخراج DNA از جدایه‌های *اشریشیا کولای* با استفاده از حرارت و طی فرآیندی مشابه با آنچه که در خصوص

باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* ذکر شد، صورت گرفت (Yadegar *et al.*, 2018). سپس جدایه‌های *شریشیا کولای* از لحاظ وجود ژن‌های حدت *LT*، *ST*، *hlyA*، *cdtB*، *ibeA*، *cnf1*، *iss*، *ireA*، *stx1*، *stx2*، *eaeA*، *CDT*، *astA* و *cnf* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مربوطه و آزمایش multiplex PCR بررسی شدند (Chapman *et al.*, 2006). به علت زیاد بودن تعداد ژن‌های مورد بررسی، ۲ بار multiplex PCR (هر بار با پرایمرهای ۷ ژن) انجام شد. بدین صورت که در حجم ۲۵ میکرولیتر، از ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix RED kit (Ampliqon, Odense, Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر فوروارد و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر ریورس، ۳ میکرولیتر DNA استخراج‌شده از نمونه و مابقی (تا حجم ۲۵ میکرولیتر) از آب مقطر مخصوص PCR استفاده شد.

جدول ۳- ژن‌های مورد بررسی در جدایه‌های *شریشیا کولای* و پروتئین حاصل از بیان آن‌ها

ژن	پروتئین‌های حاصل از بیان ژن
LT	توکسین حساس به حرارت
ST	توکسین پایدار در برابر حرارت
hlyA	آلفاهمولیزین
cdtB	توکسین متورم‌کننده کشنده سلول
ibeA	بالا بردن هجوم سلول‌های اندوتلیال میکروواسکولار مغز
cnf1	فاکتور نکروزکننده سایتوتوکسیک ۱
iss	پروتئین غشای خارجی که در افزایش زنده‌مانی سرمی و surface exclusion دخیل است.
ireA	پروتئین غشا خارجی، گیرنده سیدروفور، تعدیل‌کننده آهن
stx1	شیگاتوکسین ۱
stx2	شیگاتوکسین ۲
eaeA	پروتئین چسبیدن و محو شدن از سطح که اینتیمین را کد می‌نماید
CDT	توکسین‌های متورم‌کننده کشنده سلول
astA	انتروتوکسین EAST1 (enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin)
cnf	فاکتور نکروزکننده سایتوتوکسیک

شرایط دمایی استفاده شده به این صورت بود که واسرشت اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس ۳۰ چرخه با شرایط دمایی ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ٥٦ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. گسترش نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در نهایت هم محصولات واکنش در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۵ درصد، حاوی رنگ ایمن (safe stain) ریخته شده و پس از اتمام الکتروفورز، باندهای مربوطه با استفاده از دستگاه ژل داک (Padideh Nojen Pars, Iran) مشاهده شدند.

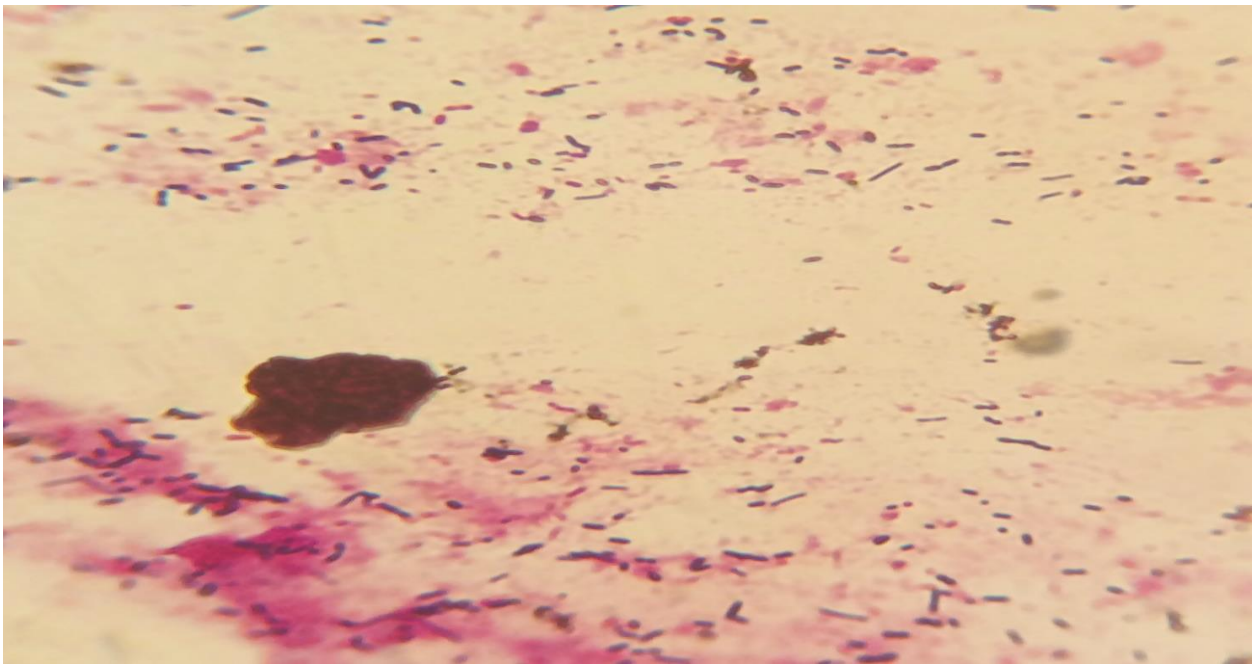
یافته‌ها

- **نتایج کالبدگشایی**: در کالبدگشایی، تعداد زیادی زخم‌های نقطه‌ای در مخاط شیردان و دانه‌های خونی

شبیه به قهوه ناشی از خون‌ریزی مخاط شیردان در محتویات شیردان حضور داشتند (شکل ۲). همچنین در کالبدگشایی بره‌ها، کلیه‌ها رنگ‌پریده بودند (شکل ۳). اما سایر اُرگان‌ها در مشاهده ماکروسکوپیک، طبیعی به نظر می‌رسیدند. همچنین در رنگ‌آمیزی گرم گسترش‌های مستقیم تهیه شده از محتویات شیردان (شکل ٤) و روده‌ها، حضور تعدادی باکتری میله‌ای شکل گرم مثبت مشاهده‌گردید.

شکل ۲- مشاهده تعداد زیادی کانون خون‌ریزی از نوع پتشی در مخاط شیردان

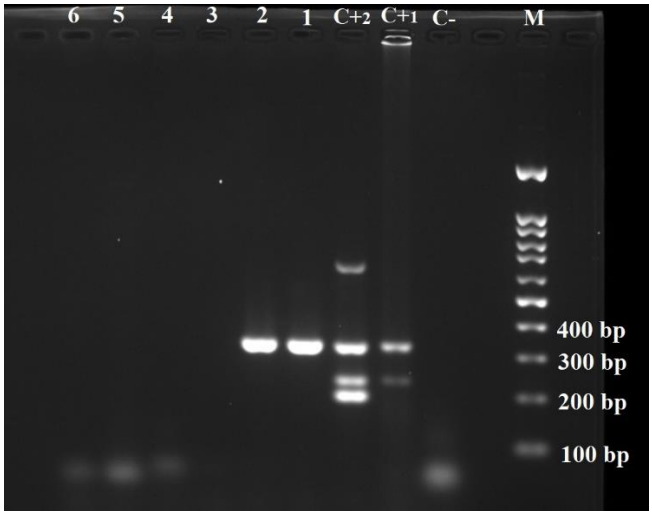
شکل ۳- نمائی از رنگ‌پریده بودن کلیه‌ها



شکل ٤- گسترش رنگ‌شده به روش گرم از محتویات شیردان (درشت‌نمایی ×۱۰۰۰).

- **نتایج کشت باکتریایی**: طی کشت‌های باکتریایی انجام شده، از نمونه‌های مغزاستخوان، مغز، قلب، کبد، کلیه و ریه هیچ باکتری جداسازی نشد. اما از نمونه‌های شیردان و روده، باکتری‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *اشریشیا کولای* جداسازی شد.

- نتایج آزمایشات مولکولی انجام‌گرفته روی باکتری‌های جداسازی‌شده: جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* به علت داشتن ژن cpa و عدم حضور ژن‌های cpb، etx و itx (شکل ۵)، جزو تیپ A باکتری مذکور بودند (Ahsani *et al.*, 2011). همچنین بررسی جدایه‌های *اشریشیا کولای*، از نظر انتروتوکسیژنیک *اشریشیا کولای* (ETEC) بودن، به دلیل عدم حضور هیچ‌یک از ژن‌های حدت *LT*، *ST*، *hlyA*، *cdtB*، *ibeA*، *cnfL*، *iss*، *ireA*، *stx1*، *stx2*، *eaeA*، *CDT*، *astA* و *cnf* در ژنوم آن‌ها، منفی ثبت گردید.



شکل ۵- مشاهده باند مربوط به ژن cpa (۳۲٤bp) در الکتروفورز ژل آگارز در چاهک‌های شماره ۱ (مربوط به *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداسازی شده از شیردان بره شماره ۱) و شماره ۲ (مربوط *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداسازی شده از روده بره شماره ۱).از سمت راست به ترتیب لدر (M)، کنترل منفی (آب)، کنترل مثبت اول (C+1) حاوی ژن‌های cpa و cpe، کنترل مثبت دوم (C+2) حاوی هر چهار ژن cpa، cpb، etx و cpe. و نمونه‌های ۱ الی ٦ قرار گرفته‌اند که در نمونه های ۱ و ۲، باند مربوطه مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

در گزارش حاضر مشخص گردید که هر ۳ بره مورد مطالعه از زخم شیردان رنج می‌برده‌اند. کشت باکتریایی و بررسی توانایی تولید توکسین (توکسین تایپینگ) از طریق miltiplex PCR نیز نشان داد که باکتری جداسازی شده از زخم‌های شیردان، *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A بود.

اطلاعات نسبتاً کمی در زمینه سبب‌شناسی و بیماری‌زایی التهاب شیردان ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A در دسترس است. با این حال، مسائل مربوط به رژیم غذایی از جمله تغذیه بیش از حد، تغذیه از آغوز آلوده یا منجمد شده و شرایطی که باعث کاهش تحرک معده‌ای-روده‌ای می‌شوند، احتمالاً در بروز بیماری مذکور نقش دارند (Roeder *et al.*, 1988). لازم به ذکر است که سویه‌های تیپA باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* به صورت طبیعی در روده

نوزادان نشخوارکننده نیز یافت می‌شوند و لذا برخی ادعا می‌کنند که جداسازی این باکتری از نوزاد نشخوارکننده مبتلا به آنتریت، نباید اهمیت خاصی داشته باشد (Timoney *et al*., 1988). اما گزارشاتی هم وجود دارند که نشان می‌دهند *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A در انتروتوکسمی کلستریدیائی دخیل بوده و همچنین مدارکی در دست است که بیان می‌کند *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A فراوان‌ترین تیپ شناسایی شده در خاک و نیز مدفوع گوسفندان می‌باشد (Itodo *et al*., 1986). در مطالعه یادگار و همکاران در سال ۲۰۱۸ هم که بر روی گوسفندان منطقه خراسان انجام گرفته، تیپA در میان جدایه‌های به دست‌آمده از مبتلایان و غیرمبتلایان به انتروتوکسمی، تیپ غالب در میان جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بوده‌است (Yadegar *et al*., 2018). همچنین گوککِی و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطالعه‌ای را برای تعیین تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* و توکسین‌های آنان در گوسفندان مبتلا به انتروتوکسمی با استفاده از الایزا و آگلوتیناسیون لاتکس انجام داده و گزارش نمودند که تیپA *کلستریدیوم پرفرینجنس* در هر دو روش، تیپ غالب می‌باشد (Geokce *et al*., 2007). گرکُ و همکاران هم در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که شیوع حضور تیپ‌های A و D *کلستریدیوم پرفرینجنس* در بره‌ها و بزغاله‌های دارای آسیب معدی-روده‌ای به ترتیب ۸٤ و ١٦ درصد است (Gerco *et al*., 2005).

التهاب شیردان ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A در گوساله گزارش شده است (Songer and Miskimins, 2005). همچنین التهاب شیردان ناشی از *کلستریدیوم سوردلی* (*Clostridium sordellii*) هم در گوساله‌ها و بره‌ها ثبت شده است (Van Kruiningen *et al*., 2009). اما در جست‌وجوی صورت گرفته توسط پژوهشگر، گزارشی از رخداد التهاب شیردان بره ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A در منابع علمی معتبر یافت نشد.

از طرف دیگر یک بیماری با نام بیماری شیردان بزاقی (abomasal salivary disease) در بره‌های ۳ تا ۱۷ روزه در یونان گزارش شده است که دارای علائم، سن ابتلا و ضایعات کالبدگشایی مشابه با بیماران مطالعه حاضر می‌باشد اما در بیماری شیردان بزاقی نتایج کشت باکتریایی شیردان قابل توجه نبودند و تا به امروز آسیب‌شناسی دقیقی برای آن شرح داده نشده است (Christodoulopoulos *et al*., 2013).

در زمینه خون‌ریزی‌های و زخم‌های شیردان که گاه در کالبدگشایی بره‌ها یا بزغاله‌ها مشاهده می‌شود (که در مطالعه حاضر هم مطابق شکل ۲ مشاهده شد) باید درنظر داشت که رخداد این زخم‌ها ممکن است با ازدیاد تولید هیستامین توسط یک جمعیت باکتریایی در شیردان (از جمله باکتری‌های شبه سارسینا، *کلستریدیوم فالاکس*، *کلستریدیوم سوردلی*، *اشریشیا کولای*، *کلستریدیوم پرفرینجنس*، گونه‌های لاکتوباسیلوس) و یا آزاد شدن هیستامین از سلول‌های اپیتلیال آسیب‌دیده، ماست‌سل‌ها و سلول‌های شبه انتروکرومافین بافت شیردان مرتبط باشد (Vatn *et al*., 2000; Vatn and Ulvand, 2000).

از طرف دیگر عقیده براین است که مهم‌ترین اقدام در پیشگیری از بیماری ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنس* در نوزادان نشخوار کننده، واکسیناسیون، مدیریت تغذیه‌ای و مدیریت دمای محیط است (Smith,

2014). اما در تاریخچه اخذ شده توسط پژوهشگر مشخص گردید که در گله مورد مطالعه از واکسن انتروتوکسمی ساخت شرکت رازی ایران در ۱ نوبت قبل از زایمان (٤ هفته پیش از زایش) استفاده شده‌بود. با توجه به این‌که واکسن کشته انتروتوکسمی ساخت شرکت رازی بر اساس برگه دستورالعمل سازنده بر عفونت‌های ناشی از تیپ‌های B، C و D *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *کلستریدوم سپتیکوم* موثر است، در این میان جای خالی ایمن سازی برعلیه تیپ A *کلستریدیوم پرفرینجنس* مشاهده می‌گردد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهائی، مطالعه حاضر نشان داد که در کالبدگشایی بره‌ها، بایستی از تشخیص عجولانه پرهیز نمود و تا حد امکان از روش‌های تشخیص آزمایشگاهی برای دستیابی به یک تشخیص صحیح، بهره جست.

سپاسگزاری

از آقای عباس علیان مالک گوسفندداری علیان شهر سرخه، قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Abdollahi, M., Mohammadi, H.R., Ahmadi-Hamedani, M., Abdollahi, M. and Shahbazi, V. (2019). The effect of oral administration of Folus (*Cassia fistula*) fruit aqueous extract on abomasal emptying rate in neonatal lambs. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 13(49): 67-106. [In Persian]
- Ahsani, M., Bafti, M.S., Esmailizadeh, A. and Mohammadabadi, M. (2011). Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Ruminant Research, 94(1): 65-69.
- Chapman, T.A., Wu, X.Y., Barchia, I. and Bettelheim, K.A. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. Applied and Environmental Microbiology, 72(7): 4782-4795.
- Christodoulopoulos, G., Scott, P.R., Jehl, N., Filioussis, G. and Smith, S.H. (2013). Clinical, microbiological and histological findings in lambs affected by 'salivary abomasum disease'. Veterinary Record, 172(4): 100-105.
- Goekce, H.I., Genç, O., Soezmen, M. and Gökçe, G. (2007). Determination of *Clostridium perfringens* toxin-types in sheep with suspected enterotoxemia in Kars Province, Turkey. The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 31(1): 355-360.
- Greco, G., Madio, A., Buonavoglia, D., Totaro, M., Corrente, M. and Martella, V. (2005). Clostridium perfringens toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. The Veterinary Journal, 170(3): 346-350.
- Itodo, A., Adesiyun, A., Adekeye, J. and Umoh, J. (1986). Toxin-types of *Clostridium perfringens* strains isolated from sheep, cattle and paddock soils in Nigeria. Veterinary Microbiology, 12(4): 93-96.

- JahedDashliboron, O. and Hassanpour, A. (2013). Survey of risk factors for the prevalence of leptospiral infection in horses of Gonbad area. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 7(26): 1844-1907. [In Persian]
- Kheirkhah, B. and Hatam-Jahromi, M. (2016). Genotypic of *Clostridium perfringens* in cold area of Kerman province. Journal of Microbial World, 9(2): 169-175.
- Khodadad, S., Mohajeri, D. and Kaffashi Elahi, R. (2018). The effect of hydroalcoholic extract of *Brasscia rapa. L* root on methotrexate induced hepatotoxicity in the rat. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 12(46): 167-191. [In Persian]
- Lotfollahzadeh, S., Abdollahi, M., Noshirvani, P., Mohammadi, H.R. and Abdollahi, M. (2020). Comparison of the effect of Microvit supplementation and Ferrodrop oral drop on primary parameters of hemogram and serum minerals in 20-day-old healthy and Pica affected lambs. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 14(53): 25-35. [In Persian]
- Mohammadzadeh, A., Mahmoodi, P., Ashrafi tamai, I. and Sharifi, A. (2017). Molecular analysis of virulence genes *stx*1, *stx*2, *eaeA* and *hlyA* in *Escherichia coli* isolated from cloacal samples in wild pigeons (*Columba livia*) and determination of their antibiotic resistance. Journal of Veterinary Research, 72(2): 219-225.
- Poursoltani**,** M.**,** Mohsenzadeh, M., Razmyar, J. and Peighambari. S.Y. (2014). Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Strains Isolated from Packed Chicken Portions. Iranian Journal of Medical Microbiology, 8(1): 8-17. [In Persian]
- Roeder, B.L., Changappa, M.M., Nagaraja, T.G., Avery, T.B. and Kennedy, G.A. (1988). Experimental induction of abomasal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration by intraruminal inoculation of *Clostridium perfringens* type A in neonatal calves. American Journal of Veterinary Research, 49(1): 201-207.
- Smith, B.P. (2014). Large Animal Internal Medicine. 5th ed., Edinburgh: Elsevier Health Sciences. pp: 723-725.
- Songer, J.G. and Miskimins, D.W. (2005). Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature. Anaerobe, 11(5): 290-294.
- Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, J.E. (1988). Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 1st ed., US, New York, Ithaca, Comstock Publishing Associates. pp: 43-51.
- Van Kruiningen, H.J., Nyaoke, C.A., Sidor, I.F., Fabis, J.J., Hinckley, L.S. and Lindell, K.A. (2009). Clostridial abomasal disease in Connecticut dairy calves. Canadian Veterinary Journal, 50(3): 857-860.
- Vatn, S. and Ulvund, M.J. (2000). Abomasal bloat, haemorrhage and ulcers in young Norwegian lambs. Veterinary Record, 146(2): 35-39.
- Vatn, S., Sjaastad, O.V. and Ulvund, M.J. (2000). Histamine in lambs with abomasal bloat, haemorrhage and ulcers. Journal of Veterinary Medicine, A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine, 47(4): 251-255.
- Yadegar, F., Nakhaei, P., Hashemtabar, G., Kalidari, G., Rashtibaf, M. and Razmyar, J. (2018). Major and minor toxins of *Clostridium perfringens* isolated from healthy and diseased sheep. Small Ruminant Research, 168(1): 1-5.