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

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

چکیده

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

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

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

مقدمه

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

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

توالی نوکلئوتیدی توکسین بتا سویه NCTC٨٥٣ در سال ۱۹۹۳ مشخص گردید (ژن *cpb*) . این توکسین که در *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ های B و C ایجاد بیماری می نماید بر روی پلاسمیدهایی با وزن ٦٥ تا ۱۱۰ کیلو باز قرار دارد (۱۸) ژن *cpb* پروتوکسین ۳۳٦ آمینو اسیدی را کد کرده که دارای سیگنال پپتید ۲۷ اسید آمینه ای بوده که در حین خروج از سلول حذف شده و نهایتا یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۵ کیلو دالتون ایجاد می شود. مکانیسم عملکرد این توکسین با اتصال به پروتئینهای متصل به گانگلیوزیدها بوده که ایجاد منفذ میکنند و با ایجاد کانال باعث تورم و لیز سلول می شود (۲۰).

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

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

مواد و روش کار

جدایه‌های باکتریایی : از ۲۱ سویه تیپ C و ۱ سویه واکسینال *کلستریدیوم پرفرینجنز*تیپ C برای بررسی استفاده گردید.

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

تخلیص DNA

*نمونه*ها در محیط کشت عصاره جگر تلقیح و در شرایط بیهوازی انکوبه گردید. سپس پاساژ آن در همین محیط کشت انجام و پس از رشد باکتری نمونه در دور rpm ٤٠٠٠ بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی تخلیه و رسوب آن با ۸۰۰ میکرولیتر آب مخلوط گشته و مجددا سانتریفوژ بمدت ۵ دقیقه انجام گردید سپس مایع رویی تخلیه به رسوب ۳۰۰ میکرولیتر بافر 1x TE اضافه گردید.این سوسپانسیون در دور rpm ٤٥٠٠ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مجددا مرحله قبل تکرار گردید. سپس ۵۰ میکرولیترلیزوزیم اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۵ میکرولیتر RNase A به نمونه اضافه گردید و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون ۸ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید. پس از ٦٠ دقیقه انکوباسیون مخلوط فنل کلروفرم اضافه و سانتریفوژ گردید. مایع رویی را برداشته و مجددا همین مرحله تکرار گردید، سپس به فاز رویی ایزوپروپانل سرد اضافه نموده و نمونه در فریزر به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از سانتریفوژ در دور rpm۱۲۰۰۰ به رسوب حاصله ۳۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۵٪ اضافه و سپس در دور rpm۱۵۰۰۰به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مجددا مرحله قبلی تکرار شده سپس مایع روئی تخلیه گردید و در ٤٥ درجه به مدت ٦٠ دقیقه قرار گرفت. در نهایت ۳۰ میکرولیتر آب به آن اضافه گردید.

آزمون PCR برای تعیین هویت توکسین آلفا

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

پس از الکتروفورز با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) رنگ آمیزی نموده در نهایت توسط دستگاه ژل داک (Gel Doc) عکس برداری شد.

آزمون PCR برای تعیین هویت توکسین بتا

برای PCR، ۱ میکرولیتر DNA template ، بافر ۱X PCR ، ۱/۵ Mm، ۱۵۰µM dNTP ، $Mgcl_2$ ، ۲ U Taq DNA پلی مراز، ۱ میکرولیتر پرایمر F (۱۰ پیکو مول)، ۱ میکرولیتر پرایمر R (۱۰ پیکو مول) و آب اضافه نموده تا به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برسد. در کنترل منفی DNA ژنومیک بجای DNA template آب ریخته سپس نمونه را در دستگاه ترموسایکلر گذاشته تا PCR انجام شود . همچنین به عنوان کنترل از *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D (CN٤٠٩) برای توکسین اپسیلون استفاده گردید (کنترل منفی). برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۱ دقیقه ای در ۹۵ درجه، ۱ دقیقه در ۵۲ درجه سانتی گراد، ۱/۳۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و متعاقب آن پلی مریزیشن برای ۱۰ دقیقه بود. سپس محصول PCR را درون چاهک های ژل آگاروز ۱٪ ریخته و پس از الکتروفورز با اتیدیوم بروماید در نهایت توسط دستگاه ژل داک عکس برداری شد. پس از تایید، مناسبترین محیط کشت جهت فعالیت توکسیسیتی انتخاب گردید.

انتخاب مناسبترین محیط کشت جهت فعالیت توکسیسیتی: در این مطالعه ٤ محیط کشت به صورت زیر تهیه گردید. محیط کشت اول TYG (حاوی Tryptic soy broth ۳٪، گلوکز۲٪ ، عصاره مخمر۱٪ و سیستیین۱٪)، محیط کشت دوم TPYG (حاوی پپتون گوشت ۵٪ ، پپتون پرتئوز۵٪ ، عصاره مخمر ۵٪ ،گلوکز ۵٪ ، سدیم تایو گلیکولات ۰/۱٪ و سیستیین ۰/۰۵٪)، محیط کشت سوم (حاوی پپتون۳٪ ، نمک ۰/۲۵٪ ، دی سدیم فسفات۱٪ ،گلوکز۱٪ ، تریس ویتامین ۰/۷۵٪) و محیط کشت چهارم (حاوی پپتون گوشت ۳٪ ،پپتون پرتئوز۲٪ ، عصاره مخمر۱٪، گلوکز۱٪ ، پودر جگر۰/۷۵٪ ، سیستیین ۰/۱٪ ، گوشت قطعه قطعه شده ۱۰٪ ، تریس ویتامین ۰/۷۵٪ ، نمک ۰/۲۵٪ و دی سدیم فسفات ۱٪). پس از تنظیم pH در داخل لوله ها تقسیم و در ۱۲۱ درجه سانتیگراد برای ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پس از کشت سویه واکسینال در ٤ محیط فوق الذکر، تست MLD به منظور مقایسه توکسین زایی مناسبترین محیط کشت و زمان انجام گردید. نهایتا محیط کشت چهارم و زمان ۵ ساعت جهت انجام تست MLD انتخاب گردید.

کشت: نمونه های مشکوک را داخل لوله جگر تلقیح نموده و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد شرایط بی هوازی انکوبه کرده، به عنوان کنترل منفی از محیط کشت تریپتیکیز سوی براس در شرایط هوازی و به عنوان کنترل مثبت از سویه واکسن *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C استفاده گردید. پس از ٢٤ ساعت سوسپانسیون در محیط کشت تلقیح و در شرایط بی هوازی به مدت ۵ ساعت انکوبه گردید. سپس تست MLD بر روی نمونه ها انجام گردید.

تست حداقل دز کشندگی (MLD) : دو میلی لیتر ازهر نمونه را در دور ٤۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد سانتریفوژ نموده سپس از سوپرناتانت رقتهای مختلف را تهیه نموده (برای تیپ C از رقت ۱/۱۰ الی ۱/۳۰۰۰) و ۰/۵ میلی لیتر از هر رقت به دو موش N.M.R.I ۱۷-۲۲ گرمی به صورت داخل وریدی تزریق گردید . آخرین رقت مرگ و میر به عنوان نتیجه تست حداقل دز کشندگی گزارش گردید. پس از انتخاب توکسیژنیک ترین جدایه آرشیو، از مناسب ترین جدایه و همچنین یک سویه واکسینال، دو واکسن آناکالچر آزمایشی با

نسبتهای *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ D ٦٠٪ ، *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ B ١٠٪ ، *کلستریدیوم پرفرینجنز* تیپ C ١٥٪ ، *کلستریدیوم سپتیکوم* ١٥٪ تهیه نموده ، پس از افزودن فرمالدئید (٠/٦٪) تست های فیزیکوشیمی (اندازه گیری pH و فرمالدئید) ، آزمون میکروبیولوژی ، بی ضرری و Residual toxicity انجام گردید.

آزمون میکروبیولوژی : دو نمونه واکسن در محیط کشت تایوگلیکولات مایع در شرایط بی‌هوازی و TSB و بلاد آگار در شرایط هوازی کشت و انکوبه شدند. بلاد آگار به مدت ٧٢ ساعت و تایوگلیکولات مایع و TSB به مدت ١٤ روز بررسی و نتایج کشت گزارش گردید (٩).

جدول ١. پرایمرهای اولیگونوکلئوتید استفاده شده، سکانس پرایمر و طول محصول PCR

ژن توکسین	پرایمرها	توالی ('3-'5)	آمپلیکون	منابع
Cpa	CPA5L	AGTCTACGCTTGGGATGGAA	٩٠٠	(٤)
	CPA5R	TTTCCTGGGTTGTCCATTTC		
Cpb	CPBL	TCCTTTCTTGAGGGAGGATAAA	٦١١	(٤)
	CPBR	TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA		
Etx	ETXII-F	5-TAC TCA TAC TGT GGGAAC TTC GAT ACA AGC-3	٤٠٢	(١٩)
	ETXII-R	°CTCATCTCCCATAACTGCACTATAATT TCC-3		

تست بی ضرری : دو نمونه واکسن به صورت زیر جلدی به دو راس گوسفند ٤٠ کیلوگرمی به میزان ٥ و١٠ میلی لیتر در ناحیه بالای کتف تزریق وگوسفندان به مدت ١٤ روزتحت نظرقرار گرفتند (٩).

Residual toxicity: دو نمونه واکسن به صورت زیر جلدی به ٥ موش NIH به میزان ٠/٥ میلی لیتر در ناحیه پا تزریق و موش ها به مدت ٧ روز تحت نظرقرار گرفتند(٩). پس از ٤٥ روز سردخانه گذاری تست پتنسی (سرم نوترالیزاسیون) در مقایسه با سویه واکسینال انجام گردید. برای این منظور ٣ میلی لیتر نمونه دو واکسن به ١٢ خرگوش ٣ کیلوگرمی به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت گردن تزریق گردید. پس از ٢٨ روز، تزریق یادآور و ١٤ روز بعد از تزریق دوم خونگیری از قلب خرگوش ها انجام گردید . سپس جدا سازی سرم و مراحل اندازه گیری میزان آنتی توکسین بتا به ترتیب زیر انجام گردید .

١. آماده سازی محلول توکسین: ١٠ میلی گرم توکسین بتا تخلیص شده در ١٠ میلی لیتر سرم فیزیولوژی یا PBS حل گردید به این صورت محلول mg/ml ١ حاصل گردید.

٢. آماده سازی آنتی توکسین استاندارد : آنتی توکسین استاندارد با مخلوط گلیسرول و سرم فیزیولوژی مخلوط سپس توسط بافر سرم فیزیولوژی رقیق گردید بطوریکه محلول IU/ml ٢/٥ تهیه گردید.

٣. آماده سازی آنتی سرم خرگوش واکسینال و آنتی سرم فیلدی : از سرم خرگوش های واکسینه رقت ١/٢ تهیه گردید.

٤. آماده سازی محلولها برای تزریق : نسبتهای ٠/١ ،٠/٣، ٠/٥، ٠/٧ و ٠/٩ از آنتی توکسین استاندارد با ١ میلی لیتر از

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

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

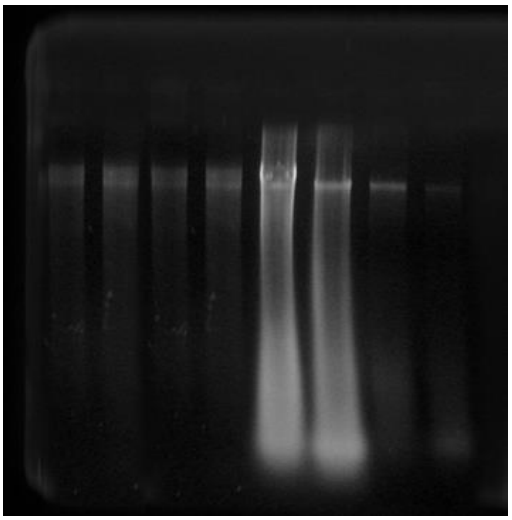
نتایج

تمام جدایه ها قادر به تخمیر قندهای گلوکز ، مالتوز ، لاکتوز و سوکروز بودند. ولی توانایی تخمیر قند سالیسین و مانیتول را نداشتند. همگی ژلاتیناز و لیسیتیناز مثبت و قادر به تخمیر طوفانی بودند ولی اندل، حرکت و کاتالاز منفی بودند. تمامی جدایه ها همولیز بتا ایجاد نموده و دراسلاید رنگ آمیزی گرم، باسیل گرم مثبت مشاهده شد.

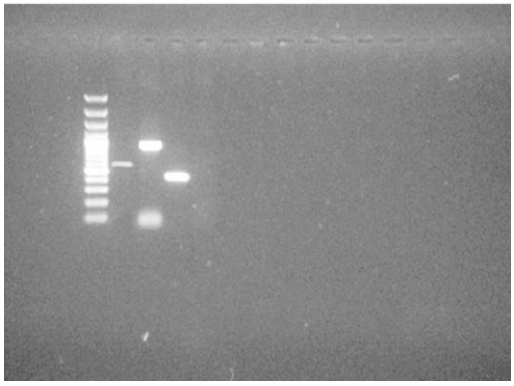
نتایج تخلیص DNA ژنومی در نگاره ۱ نشان داده شد. توکسین اپسیلون در ٤۰۰ کیلو باز ، توکسین آلفا در ۹۰۰ کیلو باز و توکسین بتا در ٦۱۱ کیلو باز و در کنترل منفی باندی مشاهده نشد. نتیجه PCR در نگاره ۲ نشان داده شد.

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

نتایج بی ضرری و Residual toxicity واکسن عارضه ای را



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



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

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

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

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

۳۳۷	++	++						۱/۵۰۰	نامشخص
۳۲۳	++	++						۱/۵۰۰	انگلستان
واکسینال	++	++	++	++	++	+	+	۱/۲۷۵۰	واکسینال

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

بحث

کلستریدیوم ها عامل بیماری های متعددی در دام و انسان می باشند و با درگیر نمودن شدید دام ها خسارات سنگین اقتصادی را به صنعت دامپروری وارد می نمایند. *کلستریدیوم* ها به دلیل ایجاد اسپور از اهمیت خاصی برخوردار می باشند. زیرا اسپور شدیدا مقاوم به عوامل فیزیکی و شیمیایی بوده و می تواند از طریق گوارشی ویا تماس با زخم باز در انسان عامل بیماریزایی گردد . *کلستریدیوم پرفرنجنز* تیپ C که عامل بیماری های مختلفی در دام می باشد دارای فاکتورهای ویرولانس متعددی می باشد. توکسین بتا به عنوان مهمترین فاکتور پاتوژنیک توسط سویه های این باکتری شناسایی شده است. مکانیزم دقیق بیماریزایی این توکسین به طور کامل شناسایی نشده است. آزمون های متفاوتی برای تشخیص *کلستریدیوم* ها ذکر شده که از جمله آن ها می توان به آزمون های باکتریایی، بیوشیمیایی (هیرولیز لیسیتین، تخمیر قندها، تخمیر طوفانی شیر تورنسل و اندل اشاره نمود (١٤). همچنین از آزمون خنثی سازی در موش آزمایشگاهی برای تشخیص استفاده می گردید که البته در مورد بتا توکسین به دلیل حساسیت توکسین باعث نتایج منفی کاذب در مواردی می گردید (١١).امروزه بیشتر از تکنیک های اینویترو برای تشخیص توکسین های باکتری با روش های متنوع استفاده می نمایند (١٥). در سال ٢٠٠٢ Aschfalk و همکاران از آنزیم ایمونواسی (٤) و در سال ٢٠٠٧ Gokce و همکاران و در سال ٢٠١٢ (١١) Hadimli و همکاران از الایزا برای تشخیص توکسین این باکتری استفاده نمودند (١٢). در سال ٢٠٠٨ Albini و همکاران PCR را به عنوان روشی قابل اطمینان برای تشخیص گزارش نمودند (١).

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

در مطالعه حاضر از تست های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی و PCR برای شناسایی *کلستریدیوم* ها استفاده شد. توکسین اپسیلون در ٤٠٠ کیلو باز ، توکسین آلفا در ٩٠٠ کیلو باز و توکسین بتا در ٦١١ کیلو باز و در کنترل منفی باندی دیده نشد . همین نتایج در مطالعه Songer و Meer نیز مشخص شد (١٩ و٦).

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

پرفرینجنز تیپ B واریانت ایرانی وجود دارد (۱۰) که در بعضی مناطق جغرافیایی مشاهده نمی شود.

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

فهرست منابع

1. Albini, S., Brodard, I., Jaussi, A., Wollschlaeger, N., Frey, J., Miserez, R., Abril, C. (2008): Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. Vet microbiol, 127: 179-185.

2- Ardehali, M., Moosawi, M., Avazpoor, J. (1988): Isolation, typing and rapid diagnosis of pathogenic clostridia from infected animals in Iran. Arch. Inst. Razi. 38, 39: 35-42.

3- Ardehali, M., Moosawi, M., Pilehchian, R. (1994): Isolation of toxigenic strains of *Clostridium perfringens* from the soil of farms in Iran. Arch.Inst.Razi. 44,45: 95-100.

4- Aschfalk, A., Younan, M., Drochner, W., Müller, W. (2002): The distribution and frequency of *Clostridium perfringens* toxinotypes in healthy sheep in Benin, West Africa. Tropical animal health and production. 34: 289-293.

5- Baharsefat, M., Ardehali, M., Amjadi, AR., Ahourai, P., Darakhshan, H., Dowran, H. (1974): First report on infectious necrotic enteritis in piglets in Iran. Arch Inst Razi. 26:31–8.

6- Baums, C.G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe R. (2004): Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol. 100: 11-16.

7- Deprez, P. (2015): *Clostridium perfringens* infections–a diagnostic challenge. Veterinary Record, 177: 388-389.

8- Elsify, A., Tarabess, R., Nayel, M., Salama, A., Allaam, M., Hassan, H. , Zaghawa, A., Elballal, S. (2016): Bacteriological and molecular studies on *Clostridium perfringens* isolated from sheep in three Egyptian provinces. African Journal of Microbiology Research, 10: 725-732.

9- European Pharmacopoeia. *Clostridium perfringens* Vaccines for Veterinary use. (2017). 363. 7. Huang, X., Wang, Y., Xing, Z., Du, K. (2016): Emission factors of air pollutants from CNG-gasoline bi-fuel vehicles: Part II. CO, HC and NOx. Sci. Total Environ. 565:698-705.

10- Ghazi, F., Younan, M., Ardehalli, M., Muller, W. (1997): Differentiation of proteinase (minor toxin lambda) in *Clostridium perfringens* strains from sheep and goats in Iran. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 104(10):443–5. [PubMed: 9394541].

11- Gokce, H.I., Genc, O., Sozmen, M., Gokce, G. (2007): Determination of *Clostridium perfringens* toxin-types in sheep with suspected enterotoxemia in Kars province, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. 31(5): 355-360.
12- Hadimli, H.H., Erganis, O., Sayin, Z., Aras. Z. (2012): Toxinotyping of *Clostridium perfringens* isolates by ELISA and PCR from lambs suspected of enterotoxemia. Turk. J. Vet. Anim Sci. 36(4): 409-415.
13- Jansen, B.C. (1961): The beta toxin of Clostridium welchii type B, Wilsdon , in relation to the production of a vaccine against lamb dysentery. Onderstepoort. J.Vet.Res.28: 495-549.
14- Mac Faddin, J.F. (2000): Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, Lippincott Williams& Wilkins, Baltimore.
15- Mainil, J. (2006): Genus Clostridium-Clostridia in medical, veterinary and food microbiology: Diagnosis and typing. Control of infectious diseases, European Communities, Printed in Luxembourg.
16- Nillo. L. (1963): Bovine enterotoxemia II. Experimental reproduction of the disease. The Canadian Veterinary Journal. 4: 288-298.
17- Sakurai, J., Nagahama, M. (2006): *Clostridium perfringens* beta-toxin: characterization and action. Toxin Rev. 25: 89–108.
18- Sayeed, S., Li, J., McClane B.A. (2010): Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. Infect immune. 78(1): 495-504.
19- Songer, J.G., Meer, R. R. (1996): Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of Clostridial enteric disease in animals. Anaerobe. 2: 197-203
20- Vidal, J.E., McClane, B.A., Saputo, J., Parker, J., Uzal, F. A. (2008): Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. Infect. Immun. 76: 4396–4404.