نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۲، بهار ۱۳۹۳

بررسی بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک آثار واکسن چهارتایی انتروتوکسمی در موش سوری

• **مجید عزتخواه** (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی منطقه جنوب شرق کشور کرمان
• **مجتبی علی ملایی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرمان
دانشجوی دکتری باکتری شناسی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان
• **امین درخشانفر**
عضو هیات علمی گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان
• **حمید شریفی**
عضو هیات علمی گروه بهداشت و مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان
• **مهرداد شمس الدینی بافتی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی منطقه جنوب شرق کشور کرمان

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۹۲
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۳۴۲۰۴۲۸
Email: m.ezatkhah@yahoo.com

چکیده

یکی از مهم ترین تست های کنترلی در مورد واکسن انتروتوکسمی تست توکسیسیتی (سنجش باقیمانده توکسین) است. ارزیابی این تست به صورت بالینی بوده و فاکتور تلفات در موش های تزریق شـــده ملاک قضاوت می باشد. هدف این مطالعه ارزیابی تست کنترلی توکسیسیتی در سطوح بالینی و هیستوپاتولوژیک و همچنین ارزیابی آثار واکسن انتروتوکسمی روی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم از جمله گلوکز خون، اوره و کراتین بوده است. در این بررسی ۲۱ سر موش سوری با میانگین وزن ۲۵ گرم به طور تصادفی به ۳ گروه جداگانه شامل گروه ۱ (واکسن)، گروه ۲ (کنترل) و گروه ۳ (محیط کشت) دسته بندی شدند. همه موش ها قبل و بعد از تزریق از نظر فاکتورهای بالینی سلامت و تلفات کنترل شدند. گروه ۱ و ۳ به ترتیب واکسن انتروتوکسمی و محیط کشت پایه واکسن را به میزان ۰/۵ میلی لیتر به روش زیرجلدی دریافت و گروه ۲ به عنوان گروه کنترل هیچ ماده ای دریافت نکردند. پس از ۴۸ ساعت خونگیری انجام شد و ارزیابی بیوشیمیایی فاکتورهای خونی روی سرم انجام گردید. سپس هر سه گروه کالبد گشایی شده و نمونه برداری جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک انجام گردید. نتایج هیستوپاتولوژیک نشان داد بافت مغز در گروه واکسن (به جز دو مورد) و گروه شاهد (به جز یک مورد) و گروه محیط کشـــت (به جز یک مورد) دچار گلیوز کانونی شـــده است. بافت کبد در همه موارد گروه واکسن و در ۶ نمونه گروه شاهد مبتلا به هپاتیت لنفوسیتی خفیف و نکروز و دژنره شدن خفیف سلول های کبدی بوده، در گروه محیط کشت کبد در ۴ مورد طبیعی و بقیه دچار ضایعاتی شبیه گروه ۱ و ۲ بوده اند. کلیه ها نیز در همه گروه ها به جز یک مورد در گروه واکسن و دو مورد در گروه محیط کشت، همگی درجاتی از تغییرات اپیتلیالی خفیف را نشـــان دادند. قلب، طحال، روده و ریه ها در همه گروه ها ســـالم بودند. جهت تجزیه و تحلیل نتایج هیستوپاتولوژیک از آزمون دقیق فیشر استفاده گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده های بیوشـــیمیایی از نرم افزار آماری Stata۱۰، آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی (post hoc) شـــفه (scheffe) استفاده گردید. در تحلیل نتایج هیستوپاتولوژیک تفاوت معنی دار آماری بین گروه های مختلف مشاهده نگردید. تحلیل داده های بیوشـــیمیایی نشان دادند که تفاوت معنی داری بین مقدار گلوکز خون در گروه ۱ با گروه های ۲ و ۳، همچنین بین مقدار اوره در گروه ۱ با ۳ وجود دارد ($p<0/05$). بر اساس نتایج این مطالعه تزریق واکسن در موش باعث ضایعه ای مرتبط با واکسن نمی شود. با توجه به نتایج بالینی، هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی نتیجه گیری می شود که فرایند تولید واکسن با دقت و به درستی انجام و تبدیل توکسین به توکسوئید که فاقد قدرت بیماریزایی است به خوبی انجام شده است و روش تست و کنترل واکسن بدون اشکال بوده است.

کلمات کلیدی: *Cl. perfringens*، انتروتوکسمی، واکسن، تست توکسیسیتی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 102 pp: 11-19

Histopathological and biochemical evaluation of tetravalent enterotoxemia vaccine effects in balb/C

By: Ezatkhah, M. Student, Razi Vaccine and Serum Research institute-Kerman Branch, Kerman, Iran (Corresponding Author; Tel: +989133420428), Alimolaei, M. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Drakhshanfar, A. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Sharifi, H. Department of Food Hygiene & Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Shamsaddini Bafti, M. Razi Vaccine and Serum Research Institute-Kerman Branch, Kerman, Iran.

Received: February 2012 **Accepted: August 2013**

Clostridium perfringens, one of the most important pathogens is the main causative agent of enterotoxemia in farm animals. Vaccination is the most effective prevention method against diseases caused by *Clostridium Perfringens.* One of the most important testes regarding vaccine quality control is toxicity test (measuring residual toxin). The evaluation of test results was done regarding to clinical factors and mortality rate of mice that received vaccine. The present study was aimed to evaluate the toxicity test of enterotoxemia vaccine clinically, histopathologically and biochemically (BS, BUN and creatine) examinations. In this study, 21 Balb/C mouse with an average weight of 25 grams were used and divided into 3 equal groups Including group 1 (vaccine), group 2 (control) and group 3 (culture medium). Health factors and mortality rate of all mice was checked before and during the survey. Groups 1 and 3 received 0.5 ml enterotoxaemia vaccine and culture medium (without bacterium) subcutaneously, respectively and group 2 (control) did not receive any material. After 48 hrs blood sampling was done and blood biochemical factors were evaluated. Finally, animals were necropsied and histopathological studies on 3 groups were performed. The stata10 software and Anova and scheffe tests were used for Statistical analysis. For analysis of histopathological results, Fisher test were used. Histopathological results showed focal gliosis in brain tissue in the vaccinated group (except in two cases), control group (except one) and culture medium group (except one). Liver tissues had mild lymphocytic hepatitis and mild hepatocellular degeneration and necrosis in all samples of vaccinated group, 6 samples of control group and 3 samples of culture medium group. Kidneys in all groups showed a mild degree of epithelial changes except of 1 case in vaccinated group and 2 cases in culture medium group. Heart, spleen, intestine and lungs were normal in all groups. Results showed no significant difference between groups. Also, biochemical Results showed a significant difference in amount of BS between group 1 and groups 2 and 3, as well as the amount of urea between group 1 and 3 ($P < 0.05$). The results of the study indicate that enterotoxemia vaccine didn't cause a significant injury in tested mice.

Keywords: *Clostridium perfringens,* Enterotoxemia, Vaccine, Toxicity Test

مقدمه

بیماری انتروتوکسمی یکی از بیماری‌های مهم جمعیت دامی بخصوص گوسفند و بز می باشد. باکتری *Cl. perfringens* عامل اصلی انتروتوکسمی و از مهمترین گونه های بیماری زا در دام است. این باکتری به تعداد فراوان در خاک، آب، هوا، غذا و دستگاه گوارش انسان و حیوانات وجود دارد. باکتری *Cl. perfringens* علاوه بر بیماری‌هایی که در انسان ایجاد می کند در دام ها نیز باعث بیماری‌های انتروتوکسمی، قلوه نرمی، اسهال عفونی بره‌های نوزاد، استراک و آنتریت هموراژیک می شود (۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۲۷، ۳۰). این باکتری چهار توکسین اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا و توکسین های فرعی را تولید می کند (۲۸، ۳۸). تیپ های مختلف این باکتری طبق جدول ۱ بر اساس نوع و مقدار این توکسین ها از یکدیگر تفکیک می شوند (۱). تیپ های مختلف باکتری بیماری های متفاوتی ایجاد می کنند و حتی ممکن است یک سویه بیماری های گوناگونی را در میزبان های مختلف ایجاد کند (۳۶ ، ۳۷).

مهم ترین راه پیشگیری از بیماری های ناشی از *Cl. perfringens* واکسیناسیون دام با تزریق واکسن انتروتوکسمی می باشد که در حال حاضر در ایران به صورت واکسن چهارتایی انتروتوکسمی (شامل تیپ های B، C، D و کلستریدیوم سپتیکوم) عرضه می شود. واکسن انتروتوکسمی تولید موسسه رازی کرمان به منظور اطمینان از صحت و سلامت، تحت تست های کنترل

جدول ۱- توکسین های اصلی تولید شده به وسیله تیپ های مختلف کلستریدیوم پرفرینژنس

type	آلفا	بتا	اپسیلون	یوتا
A	+++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	+

کیفیتی حین تولید و پس از تولید قرار می گیرد. مهم ترین تست های کنترلی تست های فیزیکوشیمی، استریلیتی، توکسیسیتی (سنجش باقیمانده توکسین)، بی ضرری و بالاترین قدرت ایمنی زائی واکسن می باشند (۱۰). یکی از مهم ترین تست های کنترلی واکسن انتروتوکسمی تست توکسیسیتی است که با تزریق ۰/۵ میلی لیتر از واکسن به روش زیر جلدی به موش سوری که تاکنون واکسن دریافت نکرده، انجام می شود (۶). ارزیابی این تست به صورت بالینی بوده و منحصراً فاکتور تلفات موش های تحت تست ملاک عمل می باشد. اما اگر به هر دلیلی خنثی سازی توکسین های واکسن به خوبی انجام نشود و تست توکسیسیتی بر مبنای مشاهدات بالینی (تلفات موش ها) نتواند مقادیر جزیی این توکسین ها را تشخیص دهد، این احتمال وجود دارد که این توکسین های خنثی نشده در بدن دام اصلی (گوسفند) عوارض ناخواسته ای ایجاد کنند.

مقالات متعددی بر آثار هیستوپاتولوژیک توکسین های باکتری کلستریدیوم در بافت های مختلف اشاره کرده اند (۷، ۸، ۱۴، ۲۲ ، ۲۴). همچنین این توکسین ها می توانند بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و ادرار از جمله گلوکز، اوره و سایر فاکتورهای بیوشیمیایی اثر بگذارند (۱۱، ۱۲، ۲۶ ، ۳۴). به همین دلایل جهت ارزیابی کارایی این تست در سطوح مختلف اقدام گردید و صحت تست توکسیسیتی در ۳ سطح کلینیکی، پاراکلینیکی (بیوشیمیایی) و هیستوپاتولوژیک در موش بعنوان یک مدل آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

هدف این طرح ارزیابی صحت تست کنترلی توکسیسیتی و ارزیابی اثرات هیستوپاتولوژیک واکسن انتروتوکسمی بر اندام های مختلف موش سوری (کبد، طحال، قلب، کلیه، ریه، مغز، روده) و ارزیابی اثرات بیوشیمیایی واکسن انتروتوکسمی بر فاکتورهای سرمی از جمله گلوکز خون، اوره و کراتین بوده است.

مواد و روش کار

حیوان : تعداد ۲۱ سر موش سوری از نژاد Balb/C با سن ۱۰- ۸ هفته و وزن ۳۰- ۲۰ گرم

واکسن : واکسن پلی والان (چهارتایی) انتروتوکسمی (تیپ B، تیپ C و تیپ *Cl. perfringens D* و ***Cl. septicum***). واکسن مورد استفاده در این تست به روش کشت دستی در تانک مخصوص ساخت واکسن تهیه و پس از کشت اولیه و انکوباسیون، به منظور دتوکسیفیکاسیون توکسین ها از فرمالدئید به نسبت ۰/۸ درصد استفاده گردید.

سایر مواد

محیط پایه تهیه واکسن چهارتایی انتروتوکسمی (فاقد کلستریدیوم ها). مشخصات محیط کشت پایه برای یک تانک ۱۶/۵ لیتری مخصوص ساخت واکسن به شرح جدول ۲ می باشد.

جدول ۲- ترکیبات محیط کشت پایه واکسن برای یک تانک ۱۶/۵ لیتری مخصوص ساخت واکسن

ترکیب	مقدار	درصد (٪)
پپتون	۵۰۰ گرم	۳/۰۰
تامپون	۱۶۰ گرم	۰/۹۶
نمک	۴۰ گرم	۰/۲۴
عصاره مخمر	۴۰ گرم	۰/۲۴
سیستئین	۳/۳ گرم	۰/۰۲
دکسترین	۳۷۵ میلی لیتر	۲/۲۷
تریس ویتامین	۱۰۰ میلی لیتر	۰/۶۰
آنتی فوم	۲/۵ میلی لیتر	۰/۰۱
آب مقطر	تا حجم ۱۶/۵ لیتر	--

در این بررسی از ۲۱ موش سوری از نژاد Balb/C که هیچ دارو یا واکسنی دریافت نکرده بودند، استفاده شد. موش ها در شروع آزمایش همگی دارای میانگین وزن ۲۵ گرم بوده و به طور تصادفی در ۳ گروه جداگانه و مساوی دسته بندی شدند. هر ۳ گروه در مدت زمان ارزیابی تحت شرایط یکسان پرورشی از جمله میزان غذا و آب مصرفی، شرایط نگهداری، دمای محیط و ... قرار داشتند. موش ها قبل از انجام آزمایش

از نظر فاکتورهای بالینی سلامت (وضعیت خوردن و آشامیدن، ادرار، شکل مدفوع، پوشش مویی بدن و رفتار) کنترل شدند.

به گروه شماره ۱ واکسن چهارتایی انتروتوکسمی به میزان ۰/۵ میلی لیتر به صورت زیر جلدی (شبیه تست توکسیسیتی) تزریق گردید (تصویر ۱). گروه شماره ۲ به عنوان گروه کنترل هیچ ماده ای دریافت نکردند. گروه شماره ۳ نیز به منظور تفریق آثار محیط کشت پایه تولید واکسن فقط محیط کشت واکسن (فاقد کلستریدیوم ها) را به میزان ۰/۵ میلی لیتر دریافت کردند. در ساعات ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ پس از تزریق وضعیت بالینی و تعداد تلفات موش ها در هر سه گروه بررسی و ثبت گردید.

شکل ۱- تزریق زیر جلدی واکسن به موش آزمایشگاهی

سپس خونگیری از قلب در لوله های بدون ماده ضد انعقاد انجام گردید و نمونه های خون به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ آزمایشگاهی مدل Hettich Tuttlingen D- ۷۸۵۳۲ سانتریفیوژ شدند.

سرم های بدست آمده به دقت جمع آوری و در میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتر در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایشات نگهداری گردیدند. نمونه های سرم جهت انجام آزمایشات بیوشیمیایی و ارزیابی فاکتورهای خونی با دستگاه اتوآنالیزور Technicon مدل ۱۰۰۰- RA مورد بررسی و سنجش قرار گرفتند (۴).

بلافاصله پس از خونگیری، با قرار دادن موش ها در محفظه سر بسته و استفاده از گاز CO_2 اتانازی انجام گردید و سپس موش ها کالبدگشایی شدند. از هر سه گروه نمونه هایی جهت مطالعات هیستوپاتولوژیک از اندام های کبد، طحال، قلب، ریه، مغز و روده اخذ گردید. نمونه ها در فرمالین ۱۰ درصد غوطه ور شده و پس از ۲۴ ساعت فرمالین نمونه ها تعویض شد. سپس نمونه ها برای انجام ارزیابی هیستوپاتولوژیک به آزمایشگاه ارسال گردیدند. پس از تهیه قالب های پارافینی، برش هائی به قطر ۵ میکرون تهیه و به وسیله هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. جهت تجزیه و تحلیل نتایج هیستوپاتولوژیک از آزمون دقیق فیشر استفاده گردید.

جهت تجزیه و تحلیل داده های بیوشیمیایی از نرم افزار آماری Stata۱۰، آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی (post hoc) شفه (scheffe) استفاده گردید. در این آزمون میزان گلوکز خون، اوره و کراتین به عنوان متغیر وابسته و گروه های مداخله به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شدند. همچنین جهت مقایسه دو به دو از تست شفه استفاده گردید (۲۹).

نتایج

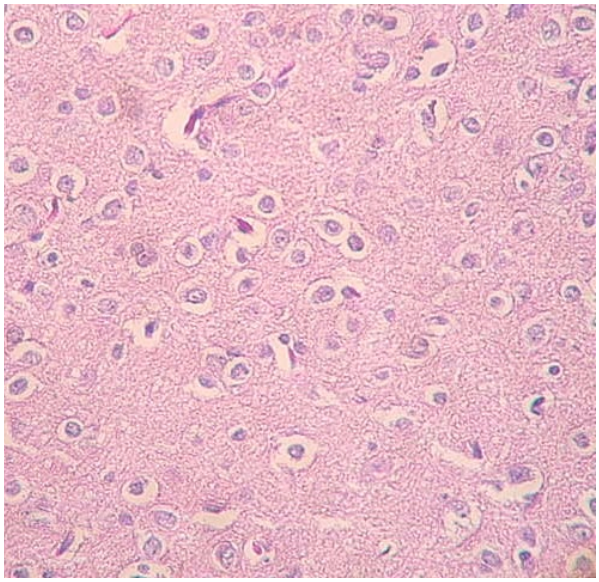
در هیچ کدام از گروه ها، قبل از تزریق تا ۴۸ ساعت پس از تزریق (زمان کالبدگشایی) تلفات مشاهده نگردید. متوسط افزایش وزن موش ها در طول آزمایش قابل توجه بود، بطوری که موش های گروه ۱ پس از ۴۸ ساعت به طور متوسط ۱ گرم افزایش وزن داشتند اما موش های گروه های ۲ و ۳ به ترتیب ۳ و ۲ گرم افزایش وزن نشان دادند. سایر فاکتورهای کنترل سلامت بالینی موش همگی در محدوده طبیعی بود و هیچ گونه تفاوت معناداری بین گروه ها مشاهده نشد.

در مشاهدات کالبدگشایی گروه شماره ۱ (گروه واکسن)، یک نمونه دچار پرخونی و تورم در کبد، طحال و دستگاه گوارش بود. ۴ مورد از ۷ مورد مبتلا به پرخونی کلیه ها بودند. دستگاه گوارش نیز در ۲ مورد از ۷ مورد دچار تورم و پرخونی بود. در سایر موارد این گروه ضایعه ای مشاهده نگردید. گروه های شماره ۲ و ۳ (به ترتیب گروه شاهد و گروه محیط کشت) از لحاظ ماکروسکوپیک ضایعه خاصی نداشتند.

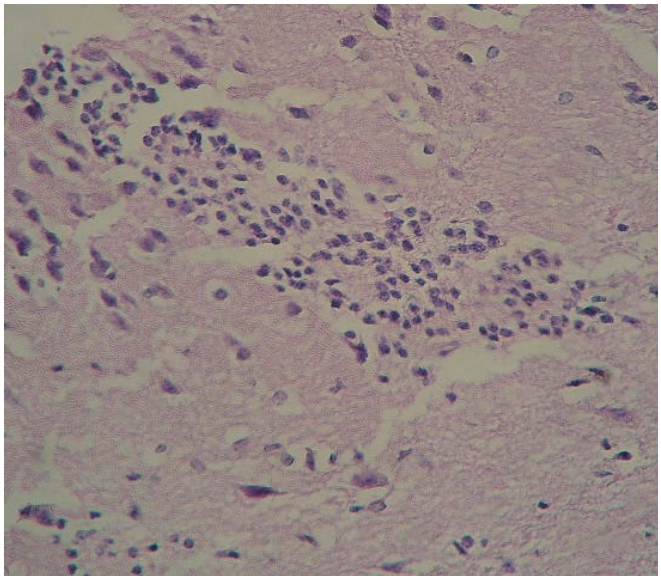
نتایج هیستوپاتولوژیک گروه واکسن، گلیوز کانونی بافت مغز را در ۵ موش نشان داد و دو مورد دیگر طبیعی بودند (شکل های ۲ و ۳).

در همه موش های این گروه، کبد مبتلا به هپاتیت لنفوسیتی خفیف و نکروز و دژنره شدن خفیف سلول های کبدی بود (شکل های ۴ و ۵). همچنین در کلیه ها درجاتی از تغییرات اپیتلیالی خفیف مشاهده گردید (به جز یک مورد).

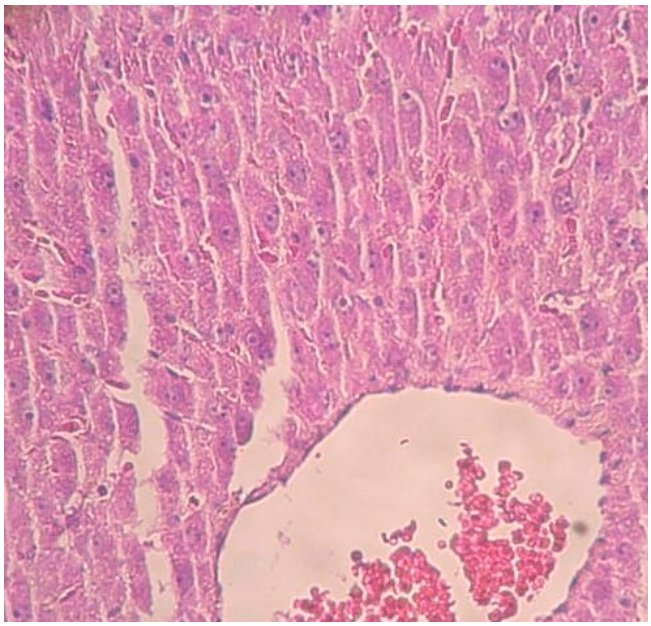
در گروه شماره ۲ (گروه شاهد) بافت های مغز به جز یک مورد، بقیه دچار گلیوز کانونی بودند. در این گروه نمونه های کبد (به جز یک مورد) مبتلا به هپاتیت لنفوسیتی خفیف و نکروز و دژنره شدن خفیف سلول های کبدی بودند. کلیه ها نیز همگی دچار تغییرات اپیتلیالی خفیف بودند. در گروه شماره ۳ (گروه محیط کشت) نیز شبیه گروه ۲، بافت های مغز به جز یک مورد طبیعی، در سایر موارد دچار گلیوز کانونی بودند. نمونه های کبد این گروه در ۴ مورد طبیعی و بقیه دچار ضایعاتی شبیه به گروه های ۱ و ۲ بودند. کلیه ها نیز ضایعاتی مشابه گروه های ۱ و ۲ داشتند (بجز ۲ مورد طبیعی). در



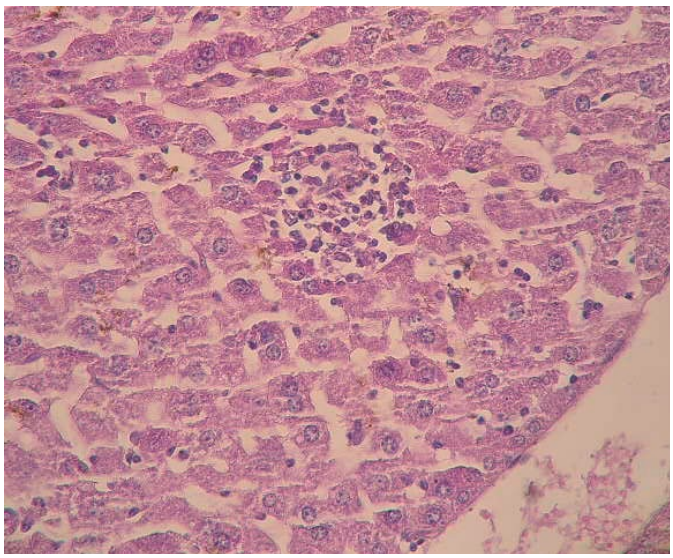
شکل ۲- ساختار طبیعی مغز. ۴۰۰×، هماتوکسیلین و ائوزین



شکل ۳- گلیوز کانونی در مغز. ۱۰۰×، هماتوکسیلین و ائوزین



شکل ۴- ساختار طبیعی کبد. ۱۰۰×، هماتوکسیلین و ائوزین



شکل ۵- کانونی از تجمع سلول های لنفوسیتی در کبد. ۱۰۰×، هماتوکسیلین و ائوزین

هـــر ۳ گروه نمونه هـــای قلب، طحال، روده و ریه ها در مشـــاهدات هیستوپاتولوژیک سالم بودند و ضایعه خاصی را نشان ندادند. تجزیه و تحلیل نتایج هیستوپاتولوژی با آزمون فیشر، تفاوت معنی دار آماری بین گروه های مختلف نشان نداد.

نتایج مربوط به آزمایش های ســـنجش فاکتورهای بیوشیمیایی (گلوکـــز خون، اوره و کراتین) در جدول ۳ ذکر شـــده اســـت. میزان گلوکـــز خون در گـــروه ۱ در مقایســـه با گروه هـــای ۲ و ۳ به طور معنی داری کمتر بـــود (p<۰/۰۵) در حالی که تفاوت آماری معنی داری بیـــن گلوکز خـــون گروه ۲ و ۳ وجود نداشـــت (p>۰/۰۵). در مورد نتایج اوره تنها تفاوت معنی دار آماری بین گروه ۱ و ۳ مشاهده گردیـــد (p<۰/۰۵) و این مقدار در گـــروه ۱ پایین تر بود. هم چنین تفاوت آمـــاری معنـــی داری در مقدار کراتین در ۳ گروه مشـــاهده نشد (p>۰/۰۵).

جدول ۳ - نتایج ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی خون (Mean ± SD)

	گلوکز خون (mg/dl)	اوره (mg/dl)	کراتین (mg/dl)
گروه ۱	۱۴۵/۲ ± ۲۶/۳	۳۸/۸ ± ۴/۶	۰/۴ ± ۰/۱
گروه ۲	۲۱۶/۰ ± ۴۰/۳	۴۹/۰ ± ۱۰/۲	۰/۷± ۰/۵
گروه ۳	۲۰۶/۱ ± ۴۱/۵	۵۰/۱ ± ۵/۲	۰/۹ ± ۰/۶

بحث و نتیجه گیری

بیمـــاری زایـــی *Cl. perfringens* به وجود ســـم های اصلی و کشـــنده (آلفا، بتا، اپســـیلون و یوتا) آن مربوط اســـت و بر اساس وجود این سموم در این باکتری آنها را به ۵ تایپ A، B، C، D و E تقســـیم بندی کرده اند (۱۷، ۳۱). همه سموم تولید شده توسط این باکتری از اهمیت خاصی برخوردار هستند (۲۳).

در هیچ کدام از گروه ها تا ۴۸ ساعت پس از تزریق تلفات مشاهده نگردید. در ارزیابی تســـت توکسیســـیتی به صورت بالینی، منحصراً فاکتور تلفات در موش های تزریق شده ملاک عمل می باشد (۶). این تست (سنجش باقیمانده توکسین) صحت فرآیند سم زدایی یا تبدیل توکسین های تولید شده توســـط باکتری به توکسوئید (فاقد قدرت بیمـــاری زایی) را کنترل می کند. لـــذا با توجه به اینکه هیچ کدام از موش ها در گروه های تحت آزمایش در مدت زمان تست تلف نشدند، می توان از عدم حضور توکســـین در واکسن اطمینان حاصل نموده و بر درستی تست کنترلی توکسیسیتی در سطح بالینی صحه گذاشت.

متوســـط افزایش وزن موش ها در طول آزمایش قابل توجه بود، بطوری که موش های گروه ۱ پس از ۴۸ ســـاعت به طور متوسط ۱ گرم افزایش وزن داشـــتند اما موش های گروه های ۲ و ۳ به ترتیب ۳ و ۲ گرم افزایش وزن نشـــان دادنـــد. وزن گیری کمتر موش های گروه ۱ و ۳ نســـبت به گروه کنترل را می توان به اســـترس ناشی از تزریق، آثار واکسن و محیط کشت در بدن موش و بی اشتهایی نسبی موش ها پس از تزریق در این دو گروه نسبت داد.

نتایج هیستوپاتولوژیک در گروه واکسن، گلیوز کانونی بافت مغز و هپاتیت لنفوسیتی خفیف و نکروز و دژنره شدن خفیف سلول های کبدی را نشان داد. همچنین در کلیه ها درجاتی از تغییرات اپیتلیالی خفیف مشاهده گردید.

در خصوص آثار هیستوپاتولوژیک توکسین های *Cl. perfringens* روی اندام های مختلف حیوانات آزمایشگاهی تحقیقات زیادی انجام شده است و مقالات متعددی بر آثار هیستوپاتولوژیک این توکسین ها در بافت های مختلف حیوانات اشـــاره کرده اند (۲، ۷، ۸، ۹، ۱۴،۱۶، ۲۲، ۲۴ ، ۳۴).

تغییرات هیســـتوپاتولوژیک انتروتوکسمی ناشـــی از *Cl. perfringens* تیپ های A، B و C در گوســـفند و بز اختصاصی نیســـتند و بنابراین اگرچه در تشـــخیص کمک کننده هستند اما جنبه تشخیص قطعی ندارند (۳۴). اما تغییرات هیســـتوپاتولوژیک کلستریدیوم پرفرینژنس تیـــپ D در مغز گوســـفند منحصر به فرد و اختصاصـــی این نوع از انتروتوکسمی می باشـــد. اکثراً ادم پروتئینی اطراف عروقی بصورت نواحی اســـیدوفیل پروتئین که سرخرگ ها و سیاهرگ های کوچک و متوســـط را احاطه کرده، دیده می شـــود (۲، ۳۴). این حالت چند ســـاعت پس از آغاز علائـــم بالینی دیده می شـــود. اگر حیوان چند ســـاعتی زنده بماند، دژنره شدن بخش ســـفید مغز، خونریزی، تورم آستروسیت ها و آکسون ها ایجاد می گردد (۲). در فرم مزمن بیماری ضایعه اختصاصی بصورت نکروز ماده سفید دیده می شود (۱۶). ادم اطراف عروقی، دژنره شـــدن و نکروز دوطرفه و قرینه پارانشیم مغز در corpus striatum، کپسول داخلی، تالاموس، مغز میانی، ساقه های مخچه ای و مراکز ماده سفید مخچه دیده می شود. (۲، ۳). ضایعات منحصر به این نواحی نبوده و ممکن اســـت در سایر قسمت های مغز از جمله کورتکس و هایپوکام نیز دیده شوند (۲).

تحقیقاتی نیز روی آثار توکســـین های کلستریدیوم پرفرینژنس در حیوانات آزمایشگاهی انجام شـــده از جمله بررسی های Finnie (۱۹۸۴) در مورد آثار هیســـتوپاتولوژیک توکســـین اپسیلون *Cl. perfringens* تیپ D روی مغز موش که ادم وازوژنیک (Va-sogenic edema) تا مالاسی کانونی (Focal malacia) را نشان داد (۸). آثار این توکسین بر انتقال مایعات و پارامترهای بیوالکتریکی روده های کوچک موش و رت آزمایشـــگاهی نیز ارزیابی شده است. در این بررســـی آثار ســـاختاری و بافتی توکسین مذکور روی روده نیز بررسی شـــد و تغییرات بافت شناسی آشکاری مشاهده نگردید، هرچند که توکســـین اپسیلون نفوذ پذیری روده ها را تغییر داده تا حـــدی که ماکرومولکول ها نیز قابلیت عبـــور پیدا کردند. (۱۴). در مطالعه حاضر نیز در روده موش های تحت بررسی ضایعه پاتولوژیک خاصی مشاهده نگردید.

در تحقیقاتی که Fernandez و همکاران (۲۰۰۷) در مورد آثار عفونت خوراکی کلستریدیوم پرفرینژنس تیپ D در موش انجام دادند، تعدادی از موش ها، ادم خفیف و اتساع گازی روده ها و در بافت شناسی نکـــروز چند کانونی حاد لوله های کلیه و ادم ریوی را داشـــتند (۷).

یافتـــه هـــای Lindsay و همـــکاران (۱۹۸۶) در خصـــوص آثـــار هیستوپاتولوژیک آنتروتوکسین ۸-۶ *Cl. perfringens* بر روی روده خرگوش، تخریب لایه اپیتلیال روده را نشـــان می دهد (۲۲). بررسی دیگری در مورد آثار هیســـتوپاتولوژیک آنتروتوکســـین کلستریدیوم پرفرینجنس در پونی ها پرخونی مشـــخص، ادم و خونریزی در روده های کوچک و بزرگ و از بین رفتن راس پرزهای روده را نشـــان داد (۲۶).

Uzal و همـــکاران (۲۰۰۴) در بررســـی یافته هـــای پاتولوژیک انتروتوکســـمی تجربی ناشی از کلستریدیوم پرفرینژنس در گوسفند، ادم اطراف عروقی یکدست پروتئینی در مغز، ادم شدید در پرده جنب، فضای بین لوبولی و اطراف عروقی و مجاری هوایی را مشاهده کردند (۳۵). اما در مطالعه حاضر هیچ گونه ضایعه خاصی در ریه ها مشاهده نگردید.

بررســـی های Itodo و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که حیوانات واکسینه شده با کلستریدیوم پرفرینژنس هیچ گونه ضایعه پاتولوژیکی در کلیه نداشتند که با نتایج این بررسی که صرفاً درجاتی از تغییرات اپیتلیالی خفیف مشاهده شد، مطابقت دارد (۱۹).

چـــون در نمونه های مغز، کبد و کلیـــه موش ها در گروه محیط کشـــت و بخصوص گروه کنترل نیز ضایعات مشابهی با گروه واکسن دیده شـــد، نمی توان این ضایعات را به دتوکسیفیکاســـیون ناقص و حضور احتمالی توکسین در واکسن نسبت داد. ضایعات کبد و کلیه را می توان به استرس ناشی از حمل و نقل یا دستکاری حین انجام کار نســـبت داد. البته ضایعه مغزی موجود در هر ۳ گروه دلیل مشخصی نـــدارد و نیاز به مطالعات اختصاصی و تکمیلـــی دارد. در هر ۳ گروه نمونه های قلب، طحال، روده و ریه ها در مشاهدات هیستوپاتولوژیک سالم بودند و ضایعه خاصی را نشان ندادند و با تجزیه و تحلیل نتایج هیســـتوپاتولوژیک توسط آزمون دقیق فیشر، تفاوت معنی دار آماری بین گروه های مختلف مشاهده نگردید.

بـــا توجه بـــه تحقیقات انجـــام شـــده در خصوص آثـــار مرگبار توکســـین های *Cl. perfringens* بر حیوانات آزمایشگاهی از جمله موش، می توان به این نکته پی برد که اگر فرایند تبدیل توکسین به توکسوئید در روند ساخت واکسن بدرستی انجام نمی شد، می بایست در اندام های مختلف موش های تحت بررسی علامت های ذکر شده در سایر منابع (ناشی از توکسین های این باکتری) دیده شود (۵، ۷، ۸، ۱۳، ۱۴، ۲۰، ۲۲ ، ۲۵). اما نتایج هیســـتوپاتولوژیک این بررســـی ضایعه ای مرتبط با واکسن را در اندامهای مختلف موش نشان نداد و این مطلب بیانگر این است که در فرایند تولید واکسن، توکسین های باکتری به توکسوئید تبدیل شده و صحت تست توکسیسیتی واکسن در سطح هیستوپاتولوژیک نیز تصدیق می گردد.

توکســـین هـــای *Cl. perfringens* می توانند بـــر فاکتورهای بیوشـــیمیایی خون و ادرار از جمله گلوکز، اوره و ســـایر فاکتورهای بیوشـــیمیایی اثر بگذارند (۱۱، ۱۲، ۲۶ و ۳۴). یک چهره برجسته و مشخص بیوشـــیمیایی ثابت شده در مسمومیت با توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرینژنس تیپ D، هایپرگلیسمی (افزایش قند خون) می باشـــد (۱۲). این افزایش قند خون پس از مســـمومیت، ناشی از بسیج ســـریع ذخایر گلیکوژن کبدی اســـت. اگر قبل از مسمومیت با توکســـین هـــای *Cl. perfringens* ، ذخایر گلیکـــوژن کبدی را تخلیـــه کنند، حیوان پس از مســـمویت افزایش قند خون را نشـــان نمی دهد. در این بررسی اختلال واضحی در تنفس بافتی در حیوانات مسموم مشاهده نگردید که این امر خود نشان می دهد هایپرگلیسمی ناشـــی از تداخل در گلیکولیز نیست (۱۲). اما OCHOA و KERN (۱۹۸۰) در بررسی آثار آنتروتوکسین کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ A در پونـــی ها نشـــان دادند که پس از تزریق این توکســـین میزان گلوکز خون مشـــخصاً کاهش مـــی یابد (۲۶). گلوکـــزاوری نیز یک چهره شاخص بیماری انتروتوکسمی می باشد. بررسی های Uzal و همکاران (۲۰۰۴) نیز حضور گلوکز در ادرار ۳ گوسفند از ۶ گوسفند تحت بررسی را نشان داد (۳۵).

رفرنس ها اعداد متفاوتی را برای محدوده طبیعی گلوکز خون در موش آزمایشگاهی اعلام کرده اند که بسته به نژاد موش، سن موش، شرایط نگهداری، نوع تغذیه، آزمایشگاه و روش نمونه برداری و روش تست آزمایشگاهی متغییر است (۳۲). محدوده مقدار طبیعی گلوکز خون در موش آزمایشـــگاهی ۲۷۸- ۱۰۶ میلی گرم بر دســـی لیتر می باشد (۳۲). با توجه به طیف وسیع اعداد پارامترهای بیوشیمیایی در حیوانات آزمایشگاهی بهتر است مبنای مقایسه در هر پروژه گروه کنترل همان پروژه باشد.

مقـــدار گلوکز خون در گروه واکســـن با میانگیـــن ۲۶/۳۲ ± ۱۴۵/۲۰ میلی گرم بر دســـی لیتر در محدوده طبیعی ذکر شده در رفرنس ها است اما مقایسه آن با سایر گروه ها از جمله گروه کنترل نشان می دهد که بقیه گروهها، دارای گلوکز خون بالاتر از گروه واکســـن هستند. مقایسه گروهها نشان می دهد مقدار گلوکز خون گروه های ۲ و ۳ بیشـــتر از گروه ۱ بوده و ایـــن تفاوت از نظر آماری معنی دار اســـت ($p<۰/۰۵$) در حالی که تفاوت آماری معنی داری بین گلوکز خون گروه ۲ و ۳ وجود ندارد ($p>۰/۰۵$). البته به این نکته باید توجه کرد که گروه کنترل و گروه محیط کشت گلوکز خون بالاتری نسبت به حد استاندارد ذکر شده در سایر رفرنس ها نشان داده اند (۳۳). اما اگر مبنا را بر اســـاس گروه کنترل تســـت حاضر در نظر بگیریم، پایین تر بودن گلوکز خون گروه واکســـن را می توان به اســـترس و بی اشتهایی پس از واکسیناسیون نسبت داد. بالا بودن گلوکز خون در گروه محیط کشت را ممکن است بتوان به ترکیبات محیط کشت از جمله دکسترین نسبت داد.

مقدار طبیعی اوره در موش آزمایشگاهی بین ۳۴- ۱۹ میلی گرم بر دسی لیتر است (۳۲). ولی در این بررسی مقدار اوره در هر ۳ گروه به طور معناداری بالاتر از محدوده طبیعی بود که شاید بتوان آن را به تغییرات اپیتلیال مشاهده شده در کلیه نسبت داد. اما مقایسه نتایج گروه ها با هم نشان داد تنها تفاوت معنی دار آماری بین گروه ۱ و ۳ وجود دارد ($p<۰/۰۵$) و این مقدار در گروه ۱ پایین تر می باشد ولی تفاوت معنی داری بین گروه های دیگر دیده نشد ($p>۰/۰۵$). مقدار طبیعی کراتین در موش آزمایشـــگاهی ۰/۸-۰/۵ میلی گرم بر دسی لیتر است (۳۲) که نتایج بررسی حاضر نشان می دهد مقدار کراتین در گروه واکســـن در محدوده طبیعی بوده اما گروه محیط کشـــت و

گروه کنترل رنج بالاتری نسبت به رفرنس ها دارند. نتایج ارزیابی های بیوشـــیمیایی نشان می دهد که باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود.

هر چند که در انجام مطالعه محدودیت هایی وجود داشـــت اما با توجه به نتایج بالینی، هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی، نتیجه گیری می شـــود که فرایند تولید واکســـن با دقت و بدرستی انجام و تبدیل توکسین به توکسوئید که فاقد قدرت بیماریزایی است به خوبی انجام شده است و روش تســـت و کنترل واکسن بدون اشکال بوده است و تجویز واکســـن به موش بعنوان یک مدل آزمایشگاهی باعث ضایعه خاصی نمی شود.

سپاسگزاری

نویســـندگان ایـــن مقاله از بخـــش پژوهش و بخـــش حیوانات آزمایشـــگاهی موسسه تحقیقات واکسن و ســـرم سازی رازی منطقه جنوب شـــرق کشور (کرمان) و همچنین همکاران محترم آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشـــگاه شهید باهنر کرمان تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع مورد استفاده

1- Bergey´s Manual of systematic Bacteriology. (1989) Volume 2: 1179-1182.

2- Buxton, D., Linklater, K.A. and Dyson, D.A. (1978) Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. *Veterinary Record,* 102, pp: 241.

3- Buxton, D., Morgan, K.T. (1976). Studies of the lesions produced in the brain of colostrum deprived lambs by Clostridium welchii (*Clostridium perfringens*) type D toxin. *Journal Comparative Pathology*, 86, pp: 435–47.

4- Campbell, L.A. and Kronfeld, D.S. (1961) Estimation of low concentrations of plasma glucose using glucose oxidase. *American Journal of Veterinary Research*, 22, pp: 587-590.

5- Castex, F., Jouvert, S., Bastide, M., Corthier, G. (1994) Kinetics of appearance of intestinal lesions in mice monoassociated with a lethal or non-lethal strain of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 40 (2), pp: 102–109.

6- European Pharmacopoeia. (2012). Seventh Edition, Volume 1-2, 881.

7- Fernandez-Miyakawa, M.E., Sayeed, S., Fisher, D.J., Poon, R., Adams, V., et al. (2007) Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection. *Infection and Immunity,* 75, pp: 4282–4288.

8- Finnie, J.W. (1984) Histopathological changes in the brain of mice given Clostridium perfringens type D epsilon toxin. *Journal of Comparative Pathology*, 94 (3), pp: 363-70.

9- Finnie, J.W., Hajduk, P. (1992) An immunohistochemical study of plasma albumin extravasation in the brain of mice after the administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. *Australian veterinary journal*, 69 (10), pp: 261–262.

10- Frerichs, G.N. and Gray, A.K. (1975) The relationship between rabbit potency test and response of sheep to clostridial vaccines. *Research in Veterinary Science*, 18, pp: 70-75.

11- Gardner, D.E. (1973) Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxaemia. Biochemical and hematological alterations in lambs. *Journal Comparative Pathology,* 83, pp: 499–529.

12- Gardner, D.E. (1973) Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxaemia Basis of the hyperglycemic response. *Journal of Comparative Pathology*, 83 (4), pp: 525–529.

13- Griner, L.A. (1961) Enterotoxemia of sheep. Effects of *Clostridium perfringens* type D toxin on the brains of sheep and mice. *American Journal of veterinary research,* 22, pp: 429–442.

14- Goldstein, J., Morris, W.E., Loidl, C.F., Tironi-Farinatti, C., McClane, B.A., et al. (2009) *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin Increases the Small Intestinal Permeability in Mice and Rats. Plos One, 4(9), e7065.

15- Gurjar, A.A., Hegde, N.V., Love, B.C. and Jayarao, B.M. (2008) Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxinotyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. Molecular and cellular Probes, 22, pp: 90–95.

16- Hartley, W.J. (1956) A focal symmetrical encephalomalacia of lambs. *New Zealand veterinary Journal*, 4, pp: 129–35.

17- Hatheway, C.L., Johnson, E.A. and Aruold, E. (1998) *Toply & Wilson's Principles of bacteriology, Virology and immunity*: Systematic bacteriology. Chapter 32: clostridium: the spore-bearing anaerobes. Vol 2, pp: 732-785.

18- Heikinheimo, A. (2008) Diagnostics and molecular epidemiology of CPE-positive *clostridium perfringens* type A. *academic dissertation, University of Helsinki,* pp: 1-76.

19- Itodo, A.E., Umoh, J.U., Adekeye, J.O., Odugbo, M.O., Haruna, G. and Sugun, M.Y. (2009). Field trial of sodium

alginate-adsorbed *Clostridium Perfringens* types C and D toxoid against clostridial enterotoxemia in sheep. *Israel Journal on Veterinary medicine,* Vol, 64, No, 1.
20- Iwao, O. and Yoshiharu O. (1984) Histopathological Effect of *Botulinum* C2 Toxin on Mouse Intestines. *Infection and Immunity*, 43 (1) pp: 54-58.
21- Komoriya, T., Hashimoto, A., Shinozaki, A., Inoue, M. and Kohno, H. (2007) Study on Partial Purification of α-Toxin Produced from Obligate Anaerobe *Clostridium perfringens. Report of the Research Institute of Industrial Technology, Nihon University,* 88, pp: 1-11.
22- Lindsay, J.A., Dennison, J.D. (1986) Histopathological effect of *clostridium perfringens* 8-6 enterotoxin on rabbit intestine. Current microbiology, 13, pp: 61-66.
23- McClane, B.A. (1996) An overview of *Clostridium perfringens enterotoxin. Toxicon*, 34, pp: 1335-1343.
24- Miyashiro, S., Nassar, A.F.C., Del Fava, C., Cabral, A.D., Silva, M. (2007) *Clostridium perfringens* types A and D associated with enterotoxemia in an 18-month-old goat. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease, 13, 4, pp: 885-893.
25- Nagahama, M., Sakurai, J. (1991) Distribution of labeled Clostridium perfringens epsilon toxin in mice. *Toxicon*, 29 (2), pp: 211–217.
26- Ochoa, R. and Kern, S. R. (1980) The Effects of Clostridium perfringens Type A Enterotoxin in Shetland Ponies-Clinical, Morphologic and Clinicopathologic Changes. *Veterinary Pathology,* 17, pp: 738-747.
27- Olad, G., Saadati, M., Kamali, M., Tavalaei, M., Pilechyan, R., Musavi, M. (2004) Detection and typing of *Clostridium perfringens* type B with PCR. *Second Congress of defense against biological agents,* Tehran, Iran.
28- Orienstein, W.A., Bernier, R.H. and Hinman, A.R. (1988) Assessing vaccine efficacy in the field. Further observation. *Epidemiologic Review*, 10, pp: 212-241.
29- Peat, J., Barton, B. (2005) *Medical Statistics:* A Guide to Data Analysis and Critical Appraisal, First edition. Blackwell Publishing Ltd.
30- Saadati, M., Olad, G., Kamali, M., Tavalaei, M., Pilechyan, R., Musavi, M. (2004) Detection and typing of *Clostridium perfringens* type C with PCR. Second Congress of defense against biological agents, Tehran, Iran.
31- Songer, J.G. (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbial Review,* 9(2), pp: 216-34.
32- Suchow, M.A., Danneman, P., Brayton, C. (2001) *The laboratory mouse*, First Edition. Pp: 8-9. CRC Press LIC.
33- Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R., Campbell, T.W. (2012) *Veterinary hematology and clinical chemistry, Wiley*- Blackwell LTD.
34- Uzal, F.A. (2004) Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. Anaerobe, 10, pp: 135–143.
35- Uzal, F.A., Kelly, W.R., Morris W.E., Bermudez, J., Baiso´n, M. (2004) The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, pp: 403–411.
36- Wasinski, B. (2007) *Contribution of Clostridium* perfringens type A with β2 toxin gene in etiology of porcine enteric diseases. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51, pp: 509-513.
37- Wojdat, E., Kwiatek, K. and Kozak, M. (2006) Occurrence and characterization of some *Clostridium species* isolated from animal feeding stuffs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy,* 50, pp: 63-67.
38- Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y. and Park, Y.H. (1997) Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 35(1), pp: 228-232.