

مقایسه قدرت تولید توکسین توسط تیپ‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس در جدایه‌های گوسفند و بز با روش الیزا

• مریم امینی

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

• مهرداد شمس‌الدینی بافتی (نویسنده مسئول)

بخش تحقیق و تولید فرآورده‌های بیولوژیک جنوب شرق کشور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم

سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

• بابک خیرخواه

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

• فرخ رخش‌زمین

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴-۰۶-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: ۱۹-۰۸-۱۴۰۰

Email: m.shamsaddini@rvsri.ac.ir



چکیده

کلستریدیوم پرفرنجنس جزو کلستریدیوم‌هایی قرار می‌گیرد که بیماری‌زایی آن‌ها به دلیل تولید توکسین و زهرا به کشته‌ای است که در داخل بدن ترشح می‌کنند و ضررهای اقتصادی زیادی را به صنعت دام وارد می‌کنند. کلستریدیوم پرفرنجنس چهار نوع توکسین اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا تولید می‌کند. در مطالعه حاضر تعداد ۸۴ جدایه از تیپ‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس که از گوسفند و بز با روش‌های بیوشیمیایی و میکروبی جداسازی و با روش PCR تعیین تیپ شده بودند جهت ارزیابی قدرت تولید توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون در شرایط برون‌تنی (In Vitro) با روش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج بدست آمده از تعداد ۸۴ جدایه، ۶۴ جدایه حضور حداقل یک توکسین را در آزمایش الیزا نشان دادند. همچنین در ۳۱ جدایه حضور فقط توکسین آلفا، شش جدایه فقط توکسین اپسیلون، ۱۷ جدایه توکسین آلفا و اپسیلون، شش جدایه توکسین آلفا و بتا و چهار جدایه هر سه توکسین آلفا، اپسیلون و بتا تایید شد و در ۲۰ جدایه حضور هیچ کدام از توکسین‌ها شناسایی نشد. نتایج حاصل با نتایج تعیین تیپ به روش PCR که روی جدایه‌ها انجام شده بود نیز مقایسه شد. با بررسی فراوانی و توزیع توکسین‌های مختلف در تیپ‌های مختلف مشخص شد که در جدایه‌های تیپ C بیشترین موارد حضور توکسین آلفا و بتا و جدایه‌های تیپ B بیشترین موارد حضور توکسین اپسیلون را نشان دادند که مشخص کرد بیماری‌زایی مرتبط با این تیپ‌ها در جدایه‌های مورد مطالعه وجود دارد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم پرفرنجنس، توکسینوآلیپ، آلفا، بتا، اپسیلون

• Veterinary Researches & Biological Products No 136 pp: 18-28

Comparison of toxin production power in different types of *Clostridium perfringens* among sheep and goats isolates by ELISA

By: Amini, M., Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. Shamsad-dini Bafti, M., (Corresponding Author) Biological Manufactures of Research & Production Department, South East Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran. Kheirkhah, B., Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. and Rokhbakhsh-Zamin, F., Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Received: 2021-09-05 Accepted: 2021-11-10

Email: m.shamsad-dini@rsvri.ac.ir

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) is one of the most common pathogens that produce an array of toxins that are secreted in the body which cause economic losses in the livestock industry. *C. perfringens* has four major toxins: alpha, beta, epsilon, and iota. A total of 84 isolates of *C. perfringens* from various types that originated from sheep and goats' isolates that were identified as *C. perfringens* by microbiological, biochemical, and toxin typed by PCR method were evaluated for production of alpha, beta, and epsilon toxin by ELISA method. Results showed that out of 84, 64 isolates showed the presence of at least one toxin in ELISA test, 31, and six isolates were positive for only alpha and only epsilon toxin, respectively, 17, six isolates show the presence of both alpha and epsilon and both alpha and beta toxins, respectively furthermore four isolates positive for the presence of all three toxins, meanwhile, 20 *C. perfringens* isolates didn't show any of the toxins. The results were compared with the results of toxinotyping by PCR method. The frequency and distribution of toxins in different strains were evaluated, so type C isolates showed the most positive cases of alpha and beta toxin and type B isolates showed the most positive cases of epsilon toxin, which could be related to the pathogenicity of these types in the isolates studied.

Key words: *Clostridium perfringens*, Toxinotyping, Alpha, Beta, Epsilon

کمی برای درمان آنها وجود دارد که به همین دلیل تأثیرات اقتصادی مهمی دارند (۷).

علاوه بر تولید توکسین‌های اصلی بیش از ۲۳ نوع توکسین دیگر نیز توسط این باکتری تولید می‌شود که در بیماری‌زایی باکتری نقش دارند بنابراین یکی از مهم‌ترین تولیدکننده‌های توکسین در بین باکتری‌ها است (۱۶). در روش جدیدی که توسط رود (Rood) و همکاران (۲۰۱۸) پیشنهاد شد دو توکسینوتایپ F و G به تیپ‌های قبلی اضافه گردید که تیپ F توکسین آلفا و Cpe و تیپ G توکسین آلفا و NetB تولید می‌کنند و هیچکدام از توکسین‌های دیگر توسط این دو تیپ شناسایی شده جدید تولید نمی‌شوند (۲۲). از این رو شناسایی توکسین‌های اصلی کلاستریدیوم پرفرنجنس و نیز سایر توکسین‌هایی که ممکن است در بیماری‌زایی آن موثر باشند در تشخیص بیماری و علل وقوع آن برای درک بهتر اپیدمیولوژی بیماری دارای اهمیت می‌باشد (۱۰، ۱۷). همچنین استفاده از این توکسین‌ها برای تولید واکسن‌های موثر به منظور جلوگیری از بیماری‌های دامی ناشی از پاتوژن‌های کلاستریدیایی یک روش رایج و بسیار موثر در ساخت واکسن

مقدمه

تیپ‌های توکسین‌زای کلاستریدیوم از عوامل قابل توجه ایجادکننده بیماری‌های روده‌ای در حیوانات اهلی هستند که یکی از اصلی‌ترین آن‌ها کلاستریدیوم پرفرنجنس است و مهم‌ترین عامل حدت آن توکسین‌هایی هستند که توسط این باکتری تولید می‌شوند (۵). کلاستریدیوم پرفرنجنس باسیل‌های گرم مثبت، اسپورزا، بی‌هوازی و کاتالاز منفی هستند که محل طبیعی زندگی آن‌ها خاک بوده و در دستگاه گوارش حیوانات و انسان به عنوان جزئی از فلور عادی نیز وجود دارند (۲۱). بر اساس توانایی در تولید چهار توکسین اصلی به پنج تیپ A تا E تقسیم‌بندی می‌شود که برای اپیدمیولوژی و تشخیص بیماری‌هایی که به وجود می‌آورد مهم است زیرا بیماری‌های مختلف توسط توکسین‌های مختلف ایجاد می‌شوند (جدول ۱) (۲۸).

بیماری‌زایی کلاستریدیوم پرفرنجنس مربوط به توکسین‌های کشنده اصلی (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) و توکسین‌های جزئی دیگر است که ترشح می‌کند. بیماری‌های روده‌ای ناشی از آن اغلب کشنده هستند و زمان

است (۲۴).

روش‌های سرولوژی مانند روش الیزا برای تشخیص توکسین‌های کلاسترییدیایی به میزان زیاد استفاده می‌شود که به طور معمول این روش‌ها برای شناسایی یک توکسین خاص در محتویات روده یا کشت خالص باکتریایی کاربرد دارند. روش‌های مبتنی بر الیزا با حساسیت بالا قادر به تشخیص توکسین‌های این باکتری می‌باشند و روشی دقیق، سریع و اختصاصی است (۱۸).

علاوه بر این با طراحی کیت‌های الیزا در مطالعات مختلف عیارسنجی آنتی‌توکسین‌های بتا و اپسیلون در تیپ‌های C و D نیز با روش الیزای غیرمستقیم انجام شده است و نتایج نشان داد که روش الیزا جایگزینی مناسب برای تست خنثی‌سازی سرم در ارزیابی ایمنی‌زایی می‌باشد (۱). مزیت روش الیزا نسبت به روش‌های درون تنی (In Vivo) سنجش توکسین، عدم استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و دقت بالای آن است به طوری که این روش قادر به تشخیص یک نانو گرم در میلی‌لیتر از توکسین‌های آلفا و بتا و ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر از توکسین اپسیلون می‌باشد (۱۹).

هدف از این مطالعه ارزیابی قدرت تولید توکسین توسط تیپ‌های مختلف جدایه‌های کلاستریدیوم پرفرنجنس به روش الیزا است که به صورت کلی در همه جدایه‌ها و همچنین به تفکیک در تیپ‌های مختلف بررسی شده است و از آنجا که یکی از روش‌های تعیین تیپ‌های مختلف کلاستریدیوم پرفرنجنس روش الیزا می‌باشد نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج تعیین تیپ به روش PCR که روی جدایه‌ها انجام شده بود نیز مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها جدایه‌ها

در مجموع ۸۴ جدایه کلاستریدیوم پرفرنجنس که از دام‌های گوسفند و بز منطقه جنوب و جنوب شرق کشور جداسازی و در آرشو میکروبی آزمایشگاه موسسه رازی (شعبه جنوب شرق کشور- کرمان) ذخیره شده بودند در این مطالعه استفاده شد (۲۵). تعیین تیپ جدایه‌ها با روش Multiplex با به کارگیری جفت پرایمر برای هر ژن آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به همراه سویه‌های مرجع استاندارد به عنوان کنترل مثبت و منفی با

برنامه دمایی مشخص انجام شده بود (جدول ۲).

براساس نتایج مولکولی ۲۲ جدایه توکسینوتیپ A، ۱۹ جدایه توکسینوتیپ B، ۲۲ جدایه توکسینوتیپ C و ۲۱ جدایه باقی‌مانده متعلق به توکسینوتیپ D بودند (۳، ۹).

آماده‌سازی جدایه‌ها

به طور خلاصه برای بازیابی جدایه‌ها، کرایوبانک‌های حاوی جدایه کلاستریدیوم پرفرنجنس (تیپ‌های C، B، A و D) از فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد خارج و روی محیط کشت بلاد آگار حاوی پنج درصد خون گوسفند دفیبرینه کشت داده شد، سپس پلیت‌ها با استفاده از دستگاه آنوکسومات (Mart Microbiology BV Drachtenthe، هلند) بی‌هوازی شد که دستگاه آنوکسومات گازهای نیتروژن (۸۰ درصد)، دی اکسید کربن (۱۰ درصد) و هیدروژن (۱۰ درصد) را جایگزین اکسیژن موجود در جار می‌کند سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، کلونی‌های ایجاد شده روی بلاد آگار از نظر ساختاری و نوع همولیز بررسی شدند. با استفاده از مشخصات ظاهری کلونی (ایجاد همولیز بتا مشخص با منطقه دو برابر همولیز بر روی بلاد آگار)، رنگ آمیزی گرم و ارزیابی میکروسکوپی و همچنین نتایج منفی در آزمون کانالاز حضور سویه‌های خالص قطعی شد.

آزمایش الیزا

به منظور تشخیص وجود توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلاستریدیوم پرفرنجنس از کیت‌های الیزای تجاری توکسین آلفا، بتا و اپسیلون ساخت شرکت Bio-x Diagnostic کشور بلژیک استفاده گردید که این کیت‌ها از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تشکیل شده‌اند که برای انجام ۴۸ تست طراحی شده است. ردیف‌های A، C، E و G هر پلیت بوسیله آنتی‌بادی‌های اختصاصی توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلاستریدیوم پرفرنجنس پوشیده شده‌اند که این آنتی‌بادی‌ها امکان جذب آنتی‌ژن خاص مربوطه را اگر در نمونه‌ها موجود باشد، دارند. ردیف‌های منفی A، B، D، F و H که به وسیله آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی پوشیده شده‌اند اجازه تمایز

جدول ۱- تیپ‌های مختلف کلاستریدیوم پرفرنجنس به همراه بیماری‌ها و توکسین‌های تولید شده توسط هر تیپ.

تیپ	بیماری	توکسین			
		آلفا	بتا	اپسیلون	یوتا
A	زردی بره‌ها	+	-	-	-
B	اسهال بره‌ها و سپتی سمی هموزایک در گوسفند و بز	+	+	+	-
C	آنتریت نکروتیک (بره، بچه خوک، گوساله و جوجه)	+	+	-	-
D	انتروتوکسمی، بیماری پرخوری، قلوه نرمی (گوسفند)	+	-	+	-
E	انتروتوکسمی (بره و گوساله)	+	-	-	+

خوانش گردید.

برای تفسیر نتایج ابتدا میزان جذب نور خالص هر گوده و همچنین کنترل مثبت را با کسر عدد جذب نوری هر گوده از کنترل منفی آن به دست آورده و سپس عدد به دست آمده بر عدد کنترل مثبت تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب شده تا درصد توکسین حاصله را نشان دهد این آزمایش تنها در صورتی معتبر است که آنتی ژن کنترل مثبت در ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری بیشتر از مقدار داده شده در برگه اطلاعات کنترل کیفی کیت ایجاد کند. براساس دستورالعمل کیت در تفسیر نهایی جواب‌های مساوی یا بالای هفت درصد از نظر حضور توکسین در آزمایش الیزا مثبت تلقی شدند.

تحلیل آماری

از آزمون مربع کای (Chi-square) برای مقایسه حضور توکسین‌ها در بین تیپ‌های مختلف، استفاده شد و همچنین از طریق آمار توصیفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف آماری معنی‌داری $P < 0.05$ تعریف شد.

نتایج

براساس نتایج الیزا از ۸۴ جدایه بررسی شده ۶۴ جدایه (۷۶ درصد) حضور حداقل یک توکسین کلاستریدیوم پرفرنجنس را نشان دادند که به تفکیک فراوانی حضور توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون در بین جدایه‌ها به ترتیب

بین واکنش ایمنی خاص و اتصال غیر اختصاصی را می‌دهند. همچنین از آنتی‌بادی مونوکلونال به عنوان کنژوگه استفاده شده که ویژگی عالی و نتایج بسیار قابل اطمینان را تضمین می‌کند.

در روش الیزا بر طبق دستورالعمل کیت ابتدا محیط تیوگلیکولات ساخته شد که حاوی پپتون کازیین تریپتیک (۳۰ گرم)، عصاره مخمر (۲۰ گرم)، گلوکز (یک گرم) و ال سیستین (یک گرم) بود که پپتون و عصاره مخمر را در ۹۵۰ میلی‌لیتر آب حل کرده و اتوکلاو شد. گلوکز و ال سیستین در ۵۰ میلی‌لیتر آب حل کرده و با فیلتراسیون استریل شد و در دمای اتاق دو محلول مخلوط شدند. کلونی‌های خالص شده بر روی پلیت بلاد آگار در محیط تیوگلیکولات ساخته شده کشت داده شده و به مدت هشت ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند و سپس به مدت پنج دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و از سوپرناتانت رویی بدون رقت‌سازی برای انجام آزمایش استفاده شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به گوده‌ها اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌شود و بعد از شستشو با اضافه کردن کنژوگه ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌شود. بعد از انکوباسیون دوم پلیت شسته می‌شود و کروموژن به گوده‌ها اضافه می‌شود.

اگر توکسین در نمونه‌های آزمایش شده وجود داشته باشد، کنژوگه به گوده مربوطه متصل می‌ماند و آنزیم کروموژن بی‌رنگ را به یک ترکیب رنگی کاتالیز می‌کند. در نهایت واکنش آنزیمی با محلول متوقف‌کننده (اسید) متوقف شده و میزان جذب نور حاصل از آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Anthus 2020 Wals) استرالی

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین تیپ جدایه‌ها.

توکسین	ژن	توالی پرایمر	آمپلیکون (bp)	رفرانس
16 Sr RNA	<i>Cl</i>	AAAGATGGCATCATCATTCAAC TACCGTCATTATCTTCCCCAAA	۳۷۹	(۳۱)
آلفا	<i>plc (cpa)</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGAAG	۳۲۴	(۳۰)
بتا	<i>cpb</i>	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	۱۹۶	(۳۰)
اپسیلون	<i>etx</i>	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTGTCTACTAAC	۶۵۵	(۳۰)
یوتا	<i>iap</i>	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTCTCTCTATTACTATACG	۴۴۶	(۳۰)

پنج جدایه (۲۲ درصد) و همچنین در تیپ D حضور توکسین های آلفا و اپسیلون فقط در نه جدایه (۴۲ درصد) تایید شد.

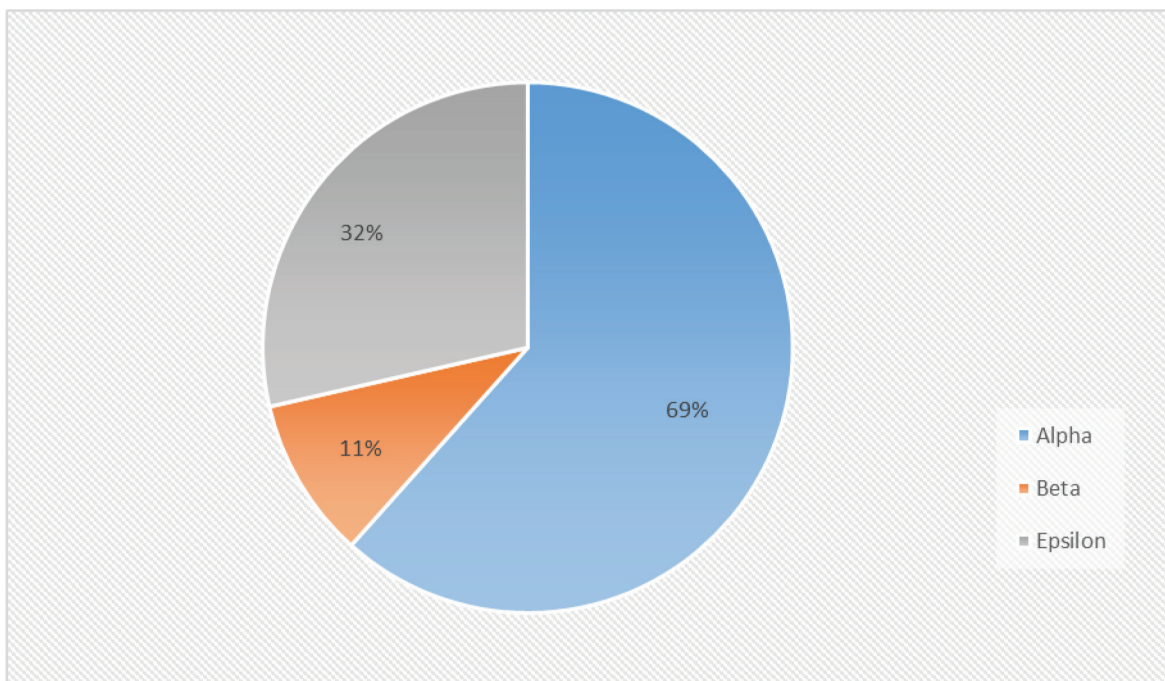
بحث

کلستریدیوم پرفرنجنس یکی از بیشترین گونه های بیماری زا در جنس کلستریدیوم است که توکسین های زیادی تولید می کند توکسین های کلستریدیوم پرفرنجنس عامل اصلی حدت و ضایعات و علائم مرتبط با بیماری های ناشی از کلستریدیوم پرفرنجنس هستند. شاید بر همین اساس گفته می شود که تیپ های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس، بیماری های گوناگونی را در دام ها ایجاد می کنند. ون (Van) و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که اختلافات در بیماری زایی سویه های کلستریدیوم پرفرنجنس ارتباط نزدیکی با تولید توکسین دارد (۳۰).

در مطالعه حاضر، حضور توکسین های آلفا، بتا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس توسط آزمایش الیزا در ۶۴ جدایه از ۸۴ جدایه مثبت بود، در حالی که وجود ژن های این توکسین ها در همه جدایه ها توسط آزمایش Multiplex PCR شده بود و بر همین اساس تعیین تیپ شده بودند. در مجموع نتایج این مطالعه عدم همخوانی یافته های سرولوژی و مولکولی را نشان داد. در مواردی باکتری ها دارای ژن توکسین هستند اما ممکن است به علت عدم بیان ژن و یا ترجمه توکسین ها تولید نشود و یا اینکه مقدار که تولید می شود آنقدر ناچیز باشد که قابل شناسایی نباشد. به نظر می رسد که وجود ژن توکسین زا در جدایه ارتباط مستقیمی با ترشح همه توکسین های قابل تشخیص با آزمایش الیزا ندارد و همچنین

معادل ۵۸ (۶۹ درصد)، ۱۰ (۱۱ درصد) و ۲۷ (۳۲ درصد) بودند (نمودار ۱). نتایج آزمایش سنجش حضور توکسین های آلفا، بتا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس با روش الیزا در نمونه هایی که از نظر حضور توکسین ها مثبت تلقی شدند در جدول ۳ آورده شده است. بطوری که در ۳۱ جدایه فقط توکسین آلفا، شش جدایه فقط توکسین اپسیلون، ۱۷ جدایه توکسین آلفا و اپسیلون، شش جدایه توکسین آلفا و بتا و چهار جدایه از نظر حضور هر سه توکسین مثبت بودند. همچنین در ۲۰ جدایه حضور هیچکدام از توکسین ها شناسایی نشد. در بررسی فراوانی توکسین ها در سویه های مختلف در تیپ A کلستریدیوم پرفرنجنس حضور توکسین آلفا در ۱۴ جدایه (۶۳ درصد)، در تیپ B کلستریدیوم پرفرنجنس حضور توکسین های آلفا، بتا و اپسیلون به ترتیب در ۱۴ (۶۶ درصد)، پنج (۲۳ درصد) و ۱۵ (۷۱ درصد) جدایه تایید شد. در تیپ C کلستریدیوم پرفرنجنس حضور توکسین های آلفا و بتا به ترتیب در ۱۵ (۷۸ درصد) و شش (۳۱ درصد) جدایه تایید شد. در تیپ D کلستریدیوم پرفرنجنس حضور توکسین های آلفا و اپسیلون به ترتیب در ۱۵ (۶۸ درصد) و ۱۲ (۵۴ درصد) جدایه تایید شد (نمودار ۲).

با مقایسه تعیین تیپ جدایه ها با روش الیزا در مجموع ۳۴ جدایه با توکسینو تایپ مشخص شده با روش PCR مطابقت داشتند. از ۲۲ جدایه تیپ A، ۱۴ جدایه (۶۳ درصد) از نظر حضور توکسین آلفا مثبت بودند در جدایه های تیپ B که انتظار حضور توکسین آلفا، بتا و اپسیلون می رفت فقط چهار جدایه (۲۱ درصد) بصورت همزمان حضور این سه توکسین را نشان دادند در تیپ C نیز حضور همزمان توکسین آلفا و بتا فقط در



نمودار ۱ - میزان حضور توکسین های مختلف در جدایه های کلستریدیوم پرفرنجنس.

جدول ۳ - نتایج آزمایش سنجش میزان توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس با روش الیزا.

نوع توکسین بر اساس نتایج آزمایش الیزا			تیپ	کد نمونه	ردیف
آلفا	بتا	اپسیلون			
+	*	*	A	KERAZI 10	۱
+	*	*	A	KERAZI 2	۲
+	*	*	A	KERAZI 7	۳
+	*	*	A	KERAZI 61	۴
+	*	*	A	KERAZI 62	۵
+	*	*	A	KERAZI 63	۶
+	*	*	A	KERAZI 64	۷
+	*	*	A	KERAZI 65	۸
+	*	*	A	KERAZI 67	۹
+	*	*	A	KERAZI 13	۱۰
+	*	*	A	KERAZI 11	۱۱
+	*	*	A	KERAZI 8	۱۲
+	*	*	A	KERAZI 1	۱۳
+	*	*	A	KERAZI 3	۱۴
+	-	-	B	KERAZI 68	۱۵
+	-	-	B	KERAZI 69	۱۶
+	-	+	B	KERAZI 25	۱۷
+	-	+	B	KERAZI 27	۱۸
-	-	+	B	KERAZI 19	۱۹
+	-	+	B	KERAZI 20	۲۰
+	-	+	B	KERAZI 22	۲۱
+	+	+	B	KERAZI 23	۲۲
-	-	+	B	KERAZI 21	۲۳
+	+	+	B	KERAZI 29	۲۴
-	-	+	B	KERAZI 24	۲۵
+	-	+	B	KERAZI 28	۲۶
-	-	+	B	KERAZI 26	۲۷
+	+	-	B	KERAZI 16	۲۸
+	-	+	B	KERAZI 17	۲۹

ادامه جدول ۳ - نتایج آزمایش سنجش میزان توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلاستریدیوم پرفرنجنس با روش الیزا.

نوع توکسین بر اساس نتایج آزمایش الیزا			تیپ	کد نمونه	ردیف
آلفا	بتا	اپسیلون			
+	-	+	B	KERAZI 18	۳۰
+	+	+	B	KERAZI 70	۳۱
+	+	+	B	KERAZI 71	۳۲
+	+	*	C	KERAZI 37	۳۳
+	-	*	C	KERAZI 35	۳۴
+	-	*	C	KERAZI 72	۳۵
+	-	*	C	KERAZI 73	۳۶
+	-	*	C	KERAZI 74	۳۷
+	-	*	C	KERAZI 75	۳۸
+	-	*	C	KERAZI 44	۳۹
+	-	*	C	KERAZI 76	۴۰
+	-	*	C	KERAZI 77	۴۱
+	-	*	C	KERAZI 78	۴۲
+	-	*	C	KERAZI 33	۴۳
+	+	*	C	KERAZI 41	۴۴
+	+	*	C	KERAZI 39	۴۵
+	+	*	C	KERAZI 42	۴۶
+	+	*	C	KERAZI 40	۴۷
+	*	*	D	KERAZI 79	۴۸
+	*	+	D	KERAZI 80	۴۹
+	*	-	D	KERAZI 59	۵۰
+	*	+	D	KERAZI 60	۵۱
+	*	+	D	KERAZI 81	۵۲
+	*	+	D	KERAZI 52	۵۳
+	*	-	D	KERAZI 54	۵۴
+	*	+	D	KERAZI 53	۵۵
-	*	+	D	KERAZI 57	۵۶
+	*	+	D	KERAZI 53	۵۷
-	*	+	D	KERAZI 50	۵۸

کلسترییدیوم پرفرنجنس تیپ D در محیط‌های مختلف با روش‌های الیزا، حداقل دوز کشنده (Minimum Lethal Dose, MLD) و سنجش میزان پروتئین تام (Total Protein) مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج نشان داد گاهی جدایه‌ها در شرایط محیطی قادر به تولید توکسین نمی‌باشند چرا که حضور توکسین بستگی به میزان باکتری و توانایی سنتز و ترشح آن دارد (۱۵).

احمدی (Ahmadi) و همکاران (۲۰۲۰) تعداد ۲۰ رأس گوسفند مشکوک به بیماری آنتروتوکسمی را از نظر بالینی (به لحاظ پاتولوژی، باکتری شناسی، سرولوژی و مولکولی) مورد ارزیابی قرار دادند که در مجموع نتایج این مطالعه وجود عدم هم‌خوانی یافته‌های بالینی، پاتولوژی، باکتری شناسی، سرولوژی و مولکولی را نشان دادند (۲).

به طور کلی روش‌های سنتی شناسایی توکسین‌ها براساس روش‌های خنثی‌سازی سرم در موش یا تست‌های پوستی در خوکچه هندی است (۲۳). ناگاهاما (Nagahama) و همکاران (۱۹۹۱) در مطالعه‌ای نشان دادند که حساسیت الیزا تقریباً ۱۰۰-۱۰٪ بالاتر از تست‌های کشندگی در موش (Minimum Lethal Dose (MLD)) با درمونکروز خوکچه هندی می‌باشد. علاوه بر این از دیگر مزایای روش الیزا کاهش استفاده از حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد (۱۹). نتایج الیزا در تشخیص توکسین باکتری کلسترییدیوم پرفرنجنس از محتویات روده‌ای مشکوک به آنتروتوکسمی، ۹۵ درصد قابل اعتماد است (۱۱).

یوزال (Uzal) و همکاران (۲۰۰۳) چهار روش را برای تشخیص توکسین اپسیلون در محتویات روده و سایر مایعات بدن گوسفند و بز مقایسه کردند که نتایج آن‌ها تفاوت قابل توجهی را در حساسیت تست‌ها نشان داد، اما حساسیت آزمایش الیزا بیشتر بود (۲۹). در مجموع تست‌های مبتنی بر الیزا با حساسیت یک تا دو نانوگرم بر میلی‌لیتر قادر به تشخیص توکسین‌های این باکتری می‌باشند (۲۷).

ممکن است برخی از سویه‌های کلسترییدیوم پرفرنجنس قادر به تولید توکسین در مقادیر قابل اندازه‌گیری در شرایط آزمایشگاهی نباشند. کیت مورد استفاده در این مطالعه براساس الیزای غیرمستقیم طراحی شده بود و سیستم تشخیصی الیزای پایه، شامل آنتی‌بادی‌هایی است که به آنزیم متصل گردیده و در حالت پایدار قابلیت کاتالیز واکنش‌ها را دارند که فرآورده نهایی آنها قابل رویت است. ضمن اینکه جایگاه‌های اتصال آنتی‌بادی برای ایجاد واکنش با آنتی‌ژن‌های اختصاصی آزاد می‌ماند. در روش شناسایی الیزا از آنتی‌بادی‌های مونو کلونال برای تشخیص توکسین‌های کلسترییدیوم پرفرنجنس استفاده می‌شود که می‌تواند منجر به کاهش واکنش متقاطع بین آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه توکسین‌ها شود و در شناسایی نوع توکسین اختصاصی عمل کند (۵). یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای تشخیص توکسین در سویه‌های کلسترییدیوم پرفرنجنس با روش الیزا این است که در ابتدا اسپورزایی را با کشت‌های خاص تحریک کرد زیرا سطوح بالای توکسین روده‌ای در زمان اسپورزایی ایجاد می‌شود (۶). در بررسی تولید توکسین توسط تیپ‌های مختلف بیشترین موارد مثبت حضور توکسین آلفا و بتا در جدایه‌های تیپ C و بیشترین موارد مثبت توکسین اپسیلون در جدایه‌های تیپ B مشاهده شد که می‌تواند مرتبط با بیماری‌زایی و قدرت تولید توکسین در جدایه‌ها باشد.

حیاتی (Hayati) و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که نتایج الیزا برای تخمین شیوع بیماری با نتایج PCR و کشت متفاوت بودند بطوری که از حدود ۲۰ درصد از موارد بالینی بیماری با وجود نتیجه منفی حضور توکسین در آزمایش الیزا باکتری جداسازی شد اما همان‌طور که آشکار است جداسازی باکتری برای تایید بیماری کافی نیست. آن‌ها استفاده از روش الیزا را برای گزارش بیماری در یک منطقه پیشنهاد دادند (۱۳). در مطالعه دیگری توانایی تولید توکسین‌های آلفا و اپسیلون در جدایه‌های

ادامه جدول ۳ - نتایج آزمایش سنجش میزان توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلسترییدیوم پرفرنجنس با روش الیزا.

نوع توکسین بر اساس نتایج آزمایش الیزا			تیپ	کد نمونه	ردیف
آلفا	بتا	اپسیلون			
+	*	-	D	KERAZI 46	۵۹
+	*	+	D	KERAZI 47	۶۰
+	*	-	D	KERAZI 82	۶۱
+	*	+	D	KERAZI 48	۶۲
+	*	+	D	KERAZI 83	۶۳
+	*	+	D	KERAZI 84	۶۴
۵۸	۱۰	۲۷	جمع کل		

* آزمایش انجام نشد.

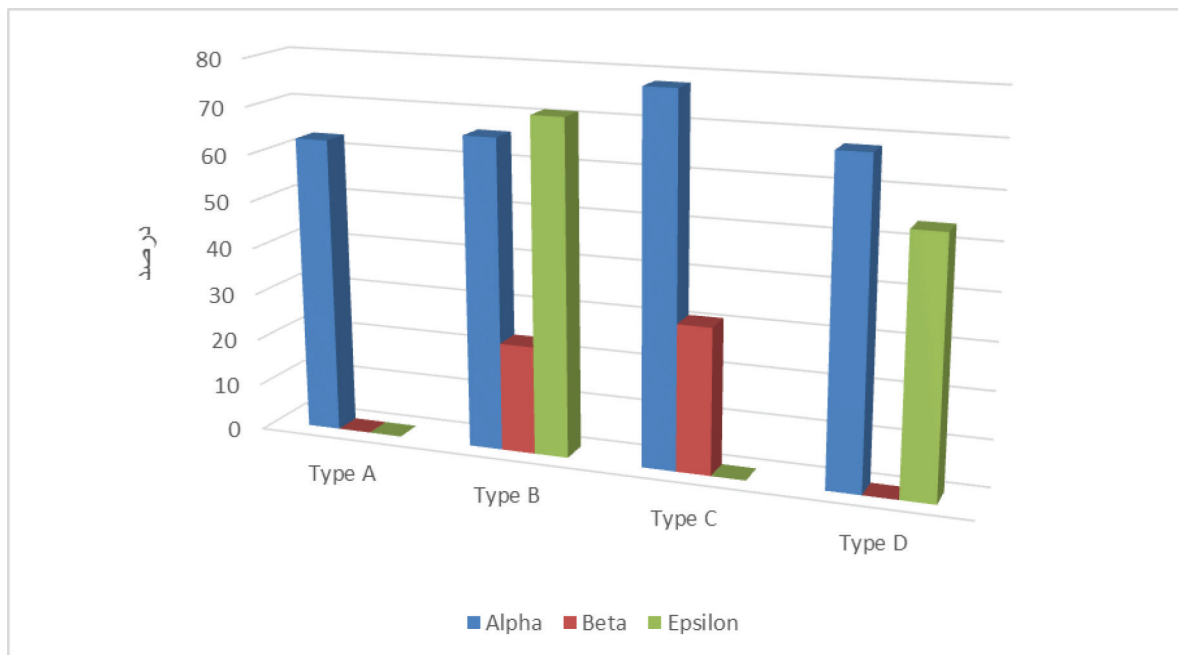
مورد نظر می‌باشد در صورت عدم ترشح توکسین ممکن است در روش‌های تعیین تیپ به روش‌های کلاسیک مانعی ایجاد کند. در حالی که تعیین تیپ کلاسیک پرفرنجس با روش PCR مبتنی بر وجود یا عدم وجود توالی ژن‌های مربوط به چهار توکسین اصلی (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) در باکتری می‌باشد و روش مطمئن‌تری در تشخیص توکسینوتایپ‌های این باکتری در گونه‌های مختلف حیوانات است. این روش بسیار کاربردی و قابل انجام در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیصی می‌باشد. از نظر تئوری، واکنش PCR می‌تواند حتی با یک مولکول DNA انجام شود و قطعه مورد نظر را تکثیر کند و از آنجایی که نتایج PCR به صورت حضور یا فقدان یک قطعه خاص DNA با اندازه ویژه ثبت می‌شود. این روش برای مطالعات اپیدمیولوژیک و ژنوتایپینگ سویه‌های مختلف در دامپزشکی نیز دارای اهمیت می‌باشد (۴، ۳۲).

بیوماس (Baums) و همکاران (۲۰۰۴) از روش PCR جهت تشخیص ژنوم توکسین‌ها استفاده کردند و نشان دادند که این روش یک ابزار مفید و مطمئن در تعیین تیپ کلاسیک پرفرنجس است (۶). جباری (Jabbari) و همکاران (۲۰۱۱) تایید کردند که PCR برای تایپینگ کلاسیک پرفرنجس از روش‌های سروژنتیک مناسبتر است و در مطالعات اپیدمیولوژیک به عنوان جایگزینی برای روش‌های قدیمی استفاده شود (۱۴). روش‌های مولکولی سرعت و دقت تشخیص را افزایش می‌دهد و از طرفی شناسایی تحت تیپ‌ها با روش الیزا امکانپذیر نیست و فقط با این روش انجام می‌شود (۲۶، ۳۳). از آنجا که ترشح توکسین نقش اصلی در بیماری‌زایی تیپ‌های مختلف کلاسیک پرفرنجس ایفا می‌کند

در مقایسه روش الیزا با سایر روش‌های معمول (خنثی‌سازی در موش و کشت میکروارگانیزم‌ها) میزان حساسیت و ویژگی برای توکسین بتا به ترتیب ۹۰/۵ و ۸۹/۲ درصد و برای توکسین اپسیلون به ترتیب ۹۷/۴ و ۹۴/۶ درصد بود (۸). گوکی (Goekce) و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند از ۲۹۵ نمونه محتویات روده گوسفندان مشکوک به آنتروتوکسمی و سالم در آزمایش‌های الیزا و Latex Agglutination Test (LAT) به ترتیب ۲۲۰ (۸۴/۶۱ درصد) و ۱۵۲ (۵۸/۴۶ درصد) نمونه از نظر تولید توکسین کلاسیک پرفرنجس مثبت بود که تعداد نمونه‌های مثبت بیشتر در آزمایش الیزا می‌تواند به دلیل این باشد که مقادیر کم توکسین‌ها ممکن است در LAT قابل تشخیص نباشند (۱۱).

در مطالعه دیگری که از روش الیزا برای شناسایی توکسین‌های کلاسیک پرفرنجس در ۱۵۰ نمونه (نمونه‌های روده‌ای در کالبد شکافی از بره‌های مشکوک به آنتروتوکسمی یا مرگ و میر ناشی از سندرم مرگ ناگهانی) استفاده شده بود بر اساس نتایج الیزا حداقل یک مورد از سه توکسین (آلفا، بتا و اپسیلون) در ۳۲ حیوان تایید شد. آنها بیان داشتند که از آنجا که آنتروتوکسمی یک بیماری پیچیده روده‌ای است، ممکن است تنها به وجود سموم مربوط نباشد و وقوع بیماری بستگی به میزان باکتری‌های موجود و سایر شرایط (محیطی و میکروبیولوژیکی) نیز دارد (۱۲).

اگر چه از روش الیزا برای شناسایی تیپ‌های مختلف باکتری کلاسیک پرفرنجس بر اساس حضور توکسین‌های اصلی نیز استفاده می‌شود اما نتایج این مطالعه نشان داد که فقط در ۳۴ جدایه هم‌خوانی بین توکسینوتایپ‌ها با روش PCR وجود داشت. از آنجا که روش الیزا منوط به ترشح توکسین



نمودار ۲ - توزیع فراوانی توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون در تیپ‌های A، B، C و D کلاسیک پرفرنجس.

- 7- Dürre, P. 2005. Handbook on clostridia. CRC press.
- 8- El Idrissi, A. H. and G. E. Ward. 1992. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Veterinary Microbiology* 31: 389-396.
- 9- Ezatkah, M., M. Alimolaei, M. Amini and M. Shamsaddini Bafti. 2016. Typing toxigenic *Clostridium perfringens* strains from the ruminants of Yazd province by multiplex polymerase chain reaction. *Int J Enteric Pathog* 4: 1-4.
- 10- Forti, K., L. Ferroni, M. Pellegrini, D. Cruciani, A. De Giuseppe, S. Crotti, P. Papa, C. Maresca, G. Severi and M. L. Marenzoni. 2020. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated in Italy. *Toxins* 12: 650.
- 11- Goekce, H. I., O. Genç, M. Soezmen and G. Gökçe. 2007. Determination of *Clostridium perfringens* toxin-types in sheep with suspected enterotoxemia in Kars Province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31: 355-360.
- 12- Hadimli, H. H., O. Erganiş, Z. Sayin and Z. Aras. 2012. Toxinotyping of *Clostridium perfringens* isolates by ELISA and PCR from lambs suspected of enterotoxemia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 36: 409-415.
- 13- Hayati, M. and Y. Tahamtan. 2020. Toxin typing of *Clostridium perfringens* associated with enterotoxaemia cases of sheep and healthy group in Fars province by PCR and ELISA methods. *Archives of Razi Institute*.76(3).
- 14- Jabbari, A., S.A.R. Afshari, M. Esmaelizad, R. Pilehchian Langroudi, M. Moosawi Shooshtari and L. Abdolmohammadi. Khiav. 2011. Molecular typing of toxigenic *Clostridium perfringens* isolated from sheep in Iran. *Archives of Razi Institute* 66: 81-86.
- 15- Karimabadizadeh, A. R. and M. Shamsaddini Bafti. 2020. Evaluation of toxinogenesis of *Clostridium perfringens* type D isolates in three kinds of culture media. *Veterinary Researches & Biological Products* 132: 2-12
- 16- Kiu, R. and L. J. Hall. 2018. An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerging Microbes & Infections* 7: 1-15.
- 17- Mehdizadeh Gohari, I., M. A. Navarro, J. Li, A. Shrestha, F. Uzal and B. A. McClane. 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence* 12: 723-753.
- 18- Møller, K. and P. Ahrens. 1996. Comparison of toxicity neutralization-, ELISA-and PCR tests for typing of *Clostridium perfringens* and detection of the enterotoxin gene by PCR. *Anaerobe* 2: 103-110.
- 19- Nagahama, M., K. Kobayashi, S. Ochi and J. Sakurai. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters* 84: 41-44.

مطالعات مربوط به توکسین‌زایی دارای اهمیت شایانی می‌باشند در حالی که بیشتر مطالعات ایران روی شناسایی و حضور ژن‌های توکسین‌ساز و توکسینوتایپینگ این باکتری انجام شده است که تحقیقات بیشتر می‌تواند اطلاعات تکمیل‌تری را در این زمینه در اختیار پژوهشگران قرار دهد (۹، ۱۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد در برخی از جدایه‌ها ترشح توکسین براساس تیپ آنها انجام نشد و بنابراین وجود ژن توکسین‌زا در جدایه ارتباط مستقیمی با ترشح همه توکسین‌های مورد انتظار در تیپ‌های مختلف در محیط‌های کشت آزمایشگاهی ندارد و در مواردی بیان و تولید توکسین مورد نظر انجام نمی‌شود. بر این اساس روش الیزا روشی دقیق و قابل اطمینانی برای مطالعات توکسین‌زایی و سنجش تولید توکسین توسط جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب اجرای پروژه تحقیقاتی به شماره ۱۸-۰۰۳-۹۶۰۰۸۹-۲-۸۵ مورد حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی انجام گرفته است. از همکاران موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه کرمان که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- 1- Abdolmohammadi Khiav, L., A. Paradise and A. Hagh Roosta. 2020. Designing of an Indirect ELISA method for the detection of Beta antitoxin of *Clostridium perfringens* Type C in Rabbit Serum. *Veterinary Researches & Biological Products* 33:21-30.
- 2-Ahmadi Rahnemoon, A., S. Esmaelizadeh, B. Mohammadian, M. Ghorbanpoor and A. Ghadrnan Mashhadi. 2020. Ovine enterotoxemia in Ahvaz region, pathological, bacteriological, serological and molecular studies. *Iranian Veterinary Journal* 16: 25-39.
- 3- Ahsani M., M. Shamsaddini Bafti, A. Esmailizadeh and M. Mohammadabadi. 2011. Genotyping of isolates of *Clostridium perfringens* from vaccinated and unvaccinated sheep. *Small Ruminant Research* 95: 65-69.
- 4- Albini, S., I. Brodard, A. Jaussi, N. Wollschläger, J. Frey, R. Miserez and C. Abril. 2008. Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Veterinary Microbiology* 127: 179-185.
- 5- Babe, T., B. Jafari and S. Bahmanpour. 2012. Typing of toxigenic isolates of *Clostridium perfringens* by ELISA in ostrich. *African Journal of Microbiology Research* 6: 1766-1769.
- 6- Baums, C. G., U. Schotte, G. Amtsberg and R. Goethe. 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 100: 11-16.

- 20- Paradise, A. and L. Abdolmohammadi Khiav. 2020. Evaluation of epsilon antitoxin of *Clostridium Perfringens* type D in the rabbit serum by indirect ELISA. *Veterinary Researches & Biological Products* 33(3): 17-30.
- 21- Quinn, P. J., B. K. Markey, F. C. Leonard, P. Hartigan, S. Fanning and E. Fitzpatrick. 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*. John Wiley & Sons.
- 22- Rood, J. I., V. Adams, J. Lacey, D. Lyras, B. A. McClane, S. B. Melville, R. J. Moore, M. R. Popoff, M. R. Sarker and J. G. Songer. 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53: 5-10.
- 23- Sawires, Y. S. and J. G. Songer. 2006. Clostridium perfringens: insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe* 12: 23-43.
- 24- Sepehrifar, H., R. Pilehchian Langroudi, S. Ataei and A. Hadjadi. 2021. Evaluation and comparison of Clostridium epsilon-alpha fusion gene expression using different commercial expression vector. *Archives of Razi Institute* 76: 7-16.
- 25- Shamsaddini Bafti, M., M. Ezzatkah, R. Pilehchian, A. R. Jabbari and M. Hayati. 2016. Isolation and identification of types of *Clostridium perfringens* in the south of the country. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO).
- 26- Songer, J. G. 1997. Molecular and immunological methods for the diagnosis of clostridial diseases. *The Clostridia. Academic Press* 491-503.
- 27- Songer, J. G. and R. R. Meer. 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.
- 28- Uzal, F. A., J. C. Freedman, A. Shrestha, J. R. Theoret, J. Garcia, M. M. Awad, V. Adams, R. J. Moore, J. I. Rood and B. A. McClane. 2014. Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiology* 9: 361-377.
- 29- Uzal, F. A., W. Kelly, R. Thomas, M. Hornitzky and F. Galea. 2003. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15: 94-99.
- 30- Van Asten, A. J., C. W. Van Der Wiel, G. Nikolaou, D. J. Houwers and A. Gröne. 2009. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* (Amsterdam) 136: 411-412.
- 31- Wu, J., W. Zhang, B. Xie, M. Wu, X. Tong, J. Kalpoe and D. Zhang. 2009. Detection and Toxin Typing of *Clostridium perfringens* in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 47(3): 807-810.
- 32- Yadegar, F., P. Nakhaei, G. Hashemtabari, G. Kalidari, M. Rashtibaf and J. Razmyar. 2018. Major and minor toxins of *Clostridium perfringens* isolated from healthy and diseased sheep. *Small Ruminant Research* 168: 1-5.
- 33- Zandi, E., M. Mohammadabadi, M. Ezatkah and A. Esmailizadeh. 2014. Typing of toxigenic isolates of *Clostridium perfringens* by multiplex PCR in ostrich. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 4: 795-801.

