DOI: 10.22092/VJ.2021.355812.1892
شماره ۱۳۶ پاییز ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

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

• مریم امینی
گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
• مهرداد شمس‌الدینی‌بافتی (نویسنده مسئول)
بخش تحقیق و تولید فرآورده های 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 رخ‌بخش‌زمین
گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۶-۱۴ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰-۰۸-۱۹
Email: m.shamsaddini@rvsri.ac.ir

چکیده

کلستریدیوم پرفرنجنس جزو کلستریدیوم‌هایی قرار می‌گیرد که بیماری‌زایی آن‌ها به دلیل تولید توکسین و زهرابه کشنده‌ای است که در داخل بدن ترشح می‌کنند و ضررهاي اقتصادي زيادي را به صنعت دام وارد مي‌كنند. 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، توکسینوتایپ، 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. Shamsaddini 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.shamsaddini@rvsri.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

مقدمه

تيپ‌هاي توكسين‌زاي كلستريديوم از عوامل قابل توجه ايجادكننده بيماري‌هاي روده‌اي در حيوانات اهلي هستند كه يكي از اصلی‌ترين آن‌ها كلستريديوم پرفرنجنس است و مهم‌ترين عامل حدت آن توكسين‌هايی هستند كه توسط اين باكتری توليد می‌شوند(۵). كلستريديوم پرفرنجنس باسيل‌هاي گرم مثبت، اسپورزا، بی‌هوازي و كاتالاز منفی هستند كه محل طبيعی زندگی آن‌ها خاك بوده و در دستگاه گوارش حيوانات و انسان به عنوان جزئی از فلور عادي نيز وجود دارند (۲۱). بر اساس توانايی در توليد چهار توكسين اصلی به پنج تيپ A تا E تقسيم‌بندی می‌شود كه براي اپيدميولوژي و تشخيص بيماري‌هايي كه به وجود می‌آورد مهم است زيرا بيماري‌هاي مختلف توسط توكسين‌های مختلف ايجاد مي‌شوند (جدول ۱) (۲۸).

بيماری‌زايی كلستريديوم پرفرنجنس مربوط به توكسين‌های كشنده اصلی (آلفا، بتا، اپسيلون و يوتا) و توكسين‌های جزيی ديگر است كه ترشح می‌كند. بيماری‌های روده‌ای ناشی از آن اغلب كشنده هستند و زمان كمی برای درمان آنها وجود دارد كه به همين دليل تأثيرات اقتصادی مهمی دارند (۷).

علاوه بر توليد توكسين‌های اصلی بيش از ۲۳ نوع توكسين ديگر نيز توسط اين باكتری توليد می‌شود كه در بيماری‌زايی باكتری نقش دارند بنابراين يكی از مهم‌ترين توليدكننده‌های توكسين در بين باكتری‌ها است (۱۶). در روش جديدي كه توسط رود (Rood) و همكاران (۲۰۱۸) پيشنهاد شد دو توكسينوتايپ F و G به تيپ‌هاي قبلي اضافه گرديد كه تيپ F توكسين آلفا و Cpe و تيپ G توكسين آلفا و NetB توليد مي‌كنند و هيچكدام از توكسين‌هاي ديگر توسط اين دو تيپ شناسايي شده جديد توليد نمي‌شوند (۲۲). از اين رو شناسايی توكسين‌های اصلی كلستريديوم پرفرنجنس و نيز ساير توكسين‌هايی كه ممكن است در بيماری‌زايی آن موثر باشند در تشخيص بيماری و علل وقوع آن برای درک بهتر اپيدميولوژی بيماری دارای اهميت می‌باشد (۱۰,۱۷). همچنين استفاده از اين توكسين‌ها برای توليد واكسن‌های موثر به منظور جلوگيری از بيماری‌های دامی ناشی از پاتوژن‌های كلستريديايی يک روش رايج و بسيار موثر در ساخت واكسن

است (۲۴).
روش‌های سرولوژی مانند روش الیزا برای تشخیص توکسین‌های کلستریدیایی 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، ۲۰). 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 کلستریدیوم 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 کلستریدیوم 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 کلستریدیوم پرفرنجنس که از دام‌های گوسفند و بز منطقه جنوب و جنوب شرق کشور جداسازی و در آرشیو میکروبی آزمایشگاه موسسه رازی(شعبه جنوب شرق کشور-کرمان) ذخیره شده بودند در این مطالعه استفاده شد (۲۵). تعیین تیپ جدایه‌ها با روش PCR 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 ، ۱۹جدایه توکسینوتیپ B، ۲۲ جدایه توکسینوتیپ C و ۲۱ جدایه باقی‌مانده متعلق به توکسینوتیپ D بودند (۹، ۳).

آماده‌سازی جدایه‌ها

به طور خلاصه برای بازیابی جدایه‌ها، کرایوبانک‌های حاوی جدایه کلستریدیوم 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 آنوکسومت 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، کلونی‌هاي 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)، رنگ‌آمیزی گرم و ارزیابی میکروسکوپی و همچنین نتایج منفی در آزمون کاتالاز حضور سویه‌های خالص قطعی شد.

آزمایش الیزا

به منظور تشخیص وجود توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلستریدیوم 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 E، C، A و G هر پلیت بوسیله آنتی‌بادی‌های اختصاصی توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس پوشیده شده‌اند که این آنتی‌بادی‌ها امکان جذب آنتی‌ژن خاص مربوطه را اگر در نمونه‌ها موجود باشد، دارند. ردیف‌های کنترل منفی F، D، B و H که به وسیله آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی پوشیده شده‌اند اجازه تمایز

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

تیپ	بیماري	توکسین			
		آلفا	بتا	اپسیلون	یوتا
A	زردي بره‌ها	+	-	-	-
B	اسهال بره‌ها و سپتي سمي هموراژیک در گوسفند و بز	+	+	+	-
C	آنتریت نکروتیک(بره، بچه خوک، گوساله و جوجه)	+	+	-	-
D	انتروتوکسمي، بیماري پرخوري، قلوه نرمي(گوسفند)	+	-	+	-
E	انتروتوکسمي(بره و گوساله)	+	-	-	+

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 سیستئین (یک گرم) بود که پپتون و عصاره مخمر را در ۹۵۰ میلی‌لیتر آب حل کرده و اتوکلاو شد. گلوکز و ال سیستئین 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) استرالیا 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 آنتی‌ژن 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 کلستریدیوم پرفرنجنس را نشان دادند که به تفکیک فراوانی حضور توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون در بین جدایه‌ها به ترتیب

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین تیپ جدایه‌ها.

توکسین	ژن	توالی پرایمر	آمپلیکون(bp)	رفرانس
16 Sr RNA	*Cl*	AAAGATGGCATCATCATTCAAC TACCGTCATTATCTTCCCCAAA	۲۷۹	(۳۱)
آلفا	*plc (cpa)*	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	۳۲۴	(۳۰)
بتا	*cpb*	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	۱۹۶	(۳۰)
اپسیلون	*etx*	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	۶۵۵	(۳۰)
یوتا	*iap*	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG	۴۴۶	(۳۰)

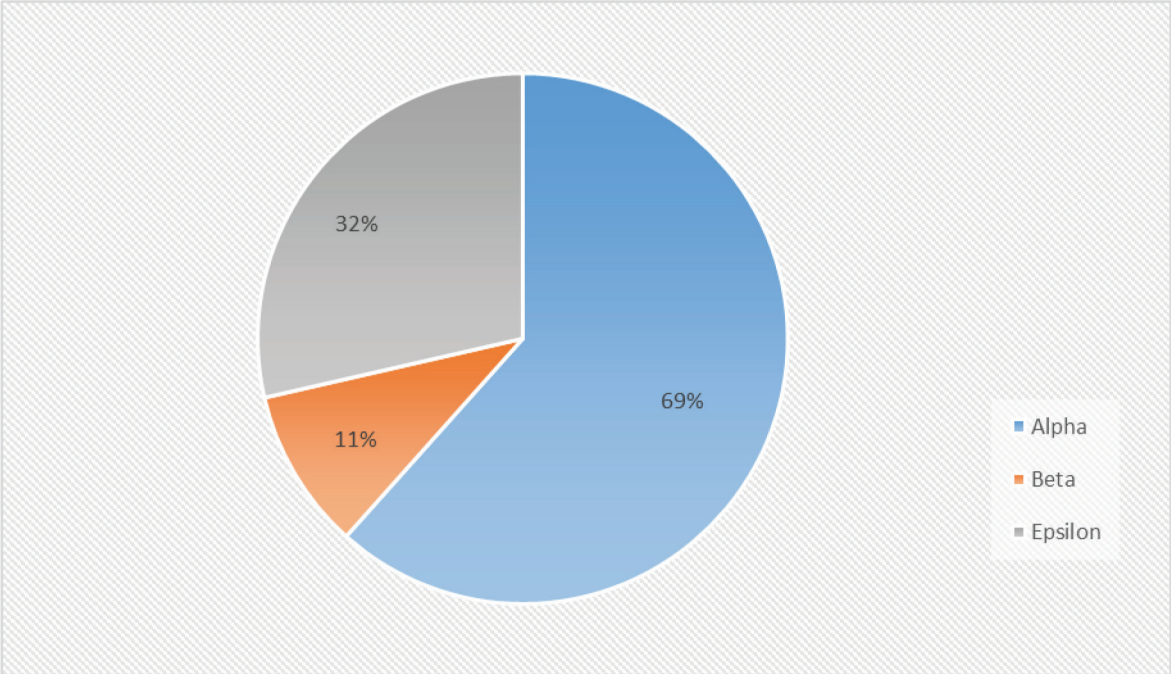
معادل ۵۸ (۶۹ درصد)، ۱۰ (۱۱ درصد) و ۲۷ (۳۲ درصد) بودند (نمودار۱). نتایج آزمایش سنجش حضور توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس با روش الیزا در نمونه‌هایي که از نظر حضورتوکسین‌ها مثبت تلقی شدند در جدول ۳ آورده شده است. بطوری‌که در ۳۱ جدایه فقط توکسین آلفا، شش جدایه فقط توکسین اپسیلون، ۱۷ جدایه توکسین آلفا و اپسیلون، شش جدایه توکسین آلفا و بتا و چهار جدایه از نظر حضور هر سه توکسین مثبت بودند. همچنین در۲۰ جدایه حضور هیچکدام از توکسین‌ها شناسایی نشد. در بررسي فراواني توکسین‌ها در سویه‌هاي مختلف در تیپ A کلستریدیوم پرفرنجنس حضور توکسین آلفا در ۱۴ جدایه (۶۳ درصد)، در تیپ B کلستریدیوم پرفرنجنس حضور توکسین‌های 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 توکسین‌های آلفا و بتا به ترتیب در ۱۵ (۷۸ درصد) و شش (۳۱ درصد) جدایه تایید شد. در تیپ D کلستریدیوم پرفرنجنس حضور توکسین‌های آلفا و اپسیلون به ترتیب در ۱۵ (۶۸ درصد) و ۱۲ (۵۴ درصد) جدایه تایید شد (نمودار ۲).

با مقایسه تعیین تیپ جدایه‌ها با روش الیزا در مجموع ۳۴ جدایه با توکسینوتایپ مشخص شده با روش PCR مطابقت داشتند. از ۲۲ جدایه تیپ A، ۱۴ جدایه (۶۳ درصد) از نظر حضور توکسین آلفا مثبت بودند در جدایه‌های تیپ B که انتظار حضور توکسین آلفا، بتا و اپسیلون می‌رفت فقط چهار جدایه (۲۱درصد) بصورت همزمان حضور این سه توکسین را نشان دادند در تیپ C نیز حضور همزمان توکسین آلفا و بتا فقط در پنج جدایه (۲۲درصد) و همچنین در تیپ D حضور توکسین‌های آلفا و اپسیلون فقط در نه جدایه (۴۲ درصد) تایید شد.

بحث

کلستریدیوم پرفرنجنس یکی از بیشترین گونه‌های بیماری‌زا در جنس کلستریدیوم است که توکسین‌های زیادی تولید می‌کند توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنجنس عامل اصلی حدت و ضایعات و علائم مرتبط با بیماری‌های ناشی از کلستریدیوم پرفرنجنس هستند. شاید بر همین اساس گفته می‌شود که تیپ‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس، بیماری‌های گوناگونی را در دام‌ها ایجاد می‌کنند. ون (Van) و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که اختلافات در بیماری‌زایی سویه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس ارتباط نزدیکی با تولید توکسین دارد (۳۰).

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



نمودار ۱ - میزان حضور توکسین‌های مختلف در جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس.

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

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

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

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

ممکن است برخی از سویه‌های کلستریدیوم 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 شناسايي الیزا از آنتی‌بادی‌هاي مونو کلونال براي تشخيص توکسين‌هاي کلستريديوم پرفرنجنس استفاده مي‌شود که می‌تواند منجر به کاهش واکنش متقاطع بين آنتی‌بادی‌هاي توليد شده عليه توکسين‌ها شود و در شناسايي نوع توکسين اختصاصی عمل کند (۵). یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای تشخیص توکسین در سویه‌های کلستریدیوم 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.

حياتي (Hayati) و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که نتايج الیزا براي تخمين شيوع بيماري با نتايج PCR و کشت متفاوت بودند بطوري که از حدود ۲۰ درصد از موارد باليني بيماري با وجود نتيجه منفي حضور توکسين در آزمايش الیزا باکتري جداسازي شد اما همان‌طور که آشکار است جداسازي باکتري براي تاييد بيماري کافي نيست. آن‌ها استفاده از روش الیزا را براي گزارش بيماري در یک منطقه پيشنهاد دادند (۱۳). در مطالعه دیگری توانایی تولید توکسین‌های آلفا و اپسیلون در جدایه‌های کلستریدیوم 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 محيطي قادر به توليد توکسين نمي‌باشند چرا که حضور توکسين بستگي به ميزان باکتری و توانايي 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 روش‌هاي سنتي شناسايي توکسين‌ها براساس روش‌هاي خنثي‌سازي سرم در موش يا تست هاي پوستي در خوکچه هندي است (۲۳). ناگاهاما(Nagahama) و همکاران (۱۹۹۱) در مطالعه‌ای نشان دادند که حساسیت الیزا تقریباً ۱۰-۱۰۰۰ بار بالاتر از تست‌های کشندگی در موش ((Minimum Lethal Dose(MLD)یا 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 کلستریدیوم 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).

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

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

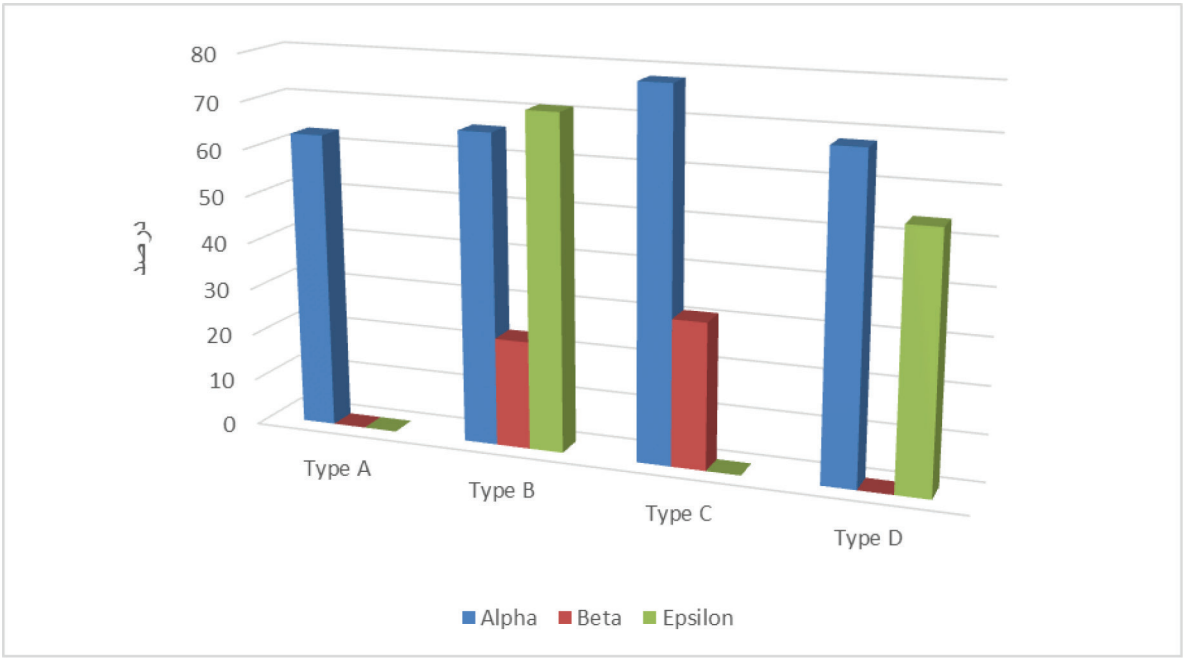
* آزمایش انجام نشد.

در مقایسه روش الیزا با سایر روش‌های معمول (خنثی‌سازی در موش و کشت میکروارگانیسم‌ها) 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 ترتیب۲۲۰ (۸۴/۶۱ درصد) و ۱۵۲ (۵۸/۴۶ درصد) نمونه از نظر تولید توکسین کلستریدیوم پرفرنجنس 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 کلستریدیوم پرفرنجنس در ۱۵۰ نمونه (نمونه‌های روده‌ای در کالبد شکافی از بره‌های مشکوک به انتروتوکسمی 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 انتروتوکسمی 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 براي شناسايي تيپ‌هاي مختلف باكتري كلستريديوم براساس حضور توکسین‌های اصلی نیز استفاده مي‌شود 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 مورد نظر می‌باشد در صورت عدم ترشح توکسین ممکن است در روش‌هاي تعيين تيپ به روش‌های کلاسیک مانعی ایجاد کند. در حالی که تعيين تيپ كلستريديوم پرفرنجنس با روش PCR مبتني بر وجود يا عدم وجود توالي ژن‌هاي مربوط به چهار توكسين اصلي (آلفا، بتا، اپسيلون و يوتا) در باكتري مي‌باشد 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 تئوري، واكنش PCR مي‌تواند حتي با يك مولكول DNA انجام شود و قطعه مورد نظر را تكثير كند و از آنجايي‌كه نتايج PCR به صورت حضور يا فقدان يك قطعه خاص DNA با اندازه ويژه ثبت مي‌شود. اين روش براي مطالعات اپيدميولوژيک و ژنوتايپينگ سويه‌هاي مختلف در دامپزشكي نيز داراي اهميت مي‌باشد (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 کلستریدیوم پرفرنجنس است (۶). جباری (Jabbari) و همکاران (۲۰۱۱) تایید کردند که PCR برای تایپینگ کلستریدیوم پرفرنجنس از روش‌های سرولوژیک مناسبتر است و در مطالعات اپیدمیولوژیک به عنوان جایگزینی برای روش‌های قدیمی استفاده شود (۱۴). روش‌هاي مولكولي سرعت و دقت تشخيص را افزايش می‌دهد و از طرفی شناسايي تحت تيپ‌ها با روش الیزا امکانپذیر نیست و فقط با این روش انجام مي‌شود (۲۶، ۳۳). از آنجا که ترشح توکسین نقش اصلی در بیماری‌زایی تیپ‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس ایفا می‌کند



نمودار ۲ - توزیع فراوانی توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون در تیپ‌هاي A ، B، C و D کلستریدیوم پرفرنجنس.

مطالعات مربوط به توکسین‌زایی دارای اهمیت شایانی می‌باشند در حالی‌که 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 توکسین‌هاي 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 ۹۶۰۰۸۹-۰۰۳-۱۸-۸۵-۲ 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. Esmaeilzadeh, B. Mohammadian, M. Ghorbanpoor and A. Ghadrdan 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.

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- Ezatkhah, 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 *Clostridum 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.

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. Haddadi. 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. Ezzatkhah, 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 Mmicrobiology* 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 *Iinvestigation* 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. Ezatkhah 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.