بررسی سویه‌های Clostridium chauvoei جدا شده از شاربن علامتی گاو در ایران

● محمود اردهالی ● محسن موسوی، اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی

چکیده
پانزده سوش *C. chauvoei* از نمونه‌های مرضی مشکوک به شاربن علامتی گاو ارسالی از نقاط مختلف کشور جدا و مورد بررسی قرار گرفت. روش جداسازی *C. chauvoei* و تأیید باکتری با روش ایمنوفلورسانت انجام گردید. قدرت همولیز زهرابه سوشهای جدا شده در روی گویچه‌های قرمز گاو، گوسفند، خرگوش و اسب و همچنین قدرت زهرابه‌زائی سوشهای جدا شده در حساسیت سوشها به ۱۷ نوع آنتی‌بیوتیک مختلف مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مقدمه

C. chauvoei یا *C. feseri* عامل شاربن علامتی گاو و گوساله می‌باشد. Arloang (۸۰-۱۸۷۹) شاربن علامتی در گاو را شناسائی کرد.

شاربن علامتی گاو در سال ۱۳۱۵ در ایران تشخیص داده شد و عامل آن *C. chauvoei* می‌باشد و در مؤسسه رازی جدا گردید. تاکنون تعداد زیادی سوشهای *C. chauvoei* از نمونه‌های مرضی ارسالی از نقاط مختلف کشور جدا و مورد بررسی قرار گرفته است.

در سال ۱۳۴۸ شاربن علامتی در استان خوزستان و فارس به شکل اپیدمی بروز نمود که به طور وسیعی گله‌های گاو را در ۱۵ روستا آلوده نمود که در این همه‌گیری حدود ۴۰۰ رأس گاو از این بیماری تلف گردیدند (۱).

C. chauvoei باسیلی بیهوازی مطلق، گرم مثبت به طول ۸-۳ میکرون و عرض ۱-۰/۵ میکرون می‌باشد. در کشت‌های جوان باسیل گرم مثبت ولی بعد از دو تا سه روز گرم منفی می‌گردند. در محل عفونت باسیل‌ها مجزا و یا دو تائی مشاهده می‌گردند.

زهرابه‌ها - *C. chauvoei* در هنگام رشد هفت نوع زهرابه تولید می‌نماید که برخی از آنها در تولید شاربن علامتی نقش اساسی دارند.

۱- زهرابه آلفا - این زهرابه خاصیت کشنده، نکروزدهنده و همولیز دارد. گلبولهای قرمز گاو و گوسفند را همولیز می‌نماید. زهرابه آلفا در کشت باکتری تا مدت سه روز ظاهر می‌گردد و نقش مهمی در ایمنی دامها بر ضد شاربن علامتی دارد.

۲- زهرابه بتا - این زهرابه خاصیت دآکسی ریبونوکلئاز داشته و موجب تخریب هسته سلولها می‌گردد. به حرارت مقاوم بوده و ده دقیقه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد را تحمل نموده بدون اینکه قدرت خود را از دست بدهد.

۳- زهرابه گاما - این آنزیم هیالورونیداز می‌باشد. در روی اسیدهیالورونیک که میان پیوند سلولها را تشکیل می‌دهد اثر نموده و رشد باکتری و نفوذ زهرابه‌ها را تسهیل می‌نماید.

۴- آنزیم دلتا - همولیتیک و حساس به اکسیژن می‌باشد.

علاوه بر زهرابه‌های فوق‌الذکر تعداد سه نوع پادگن دیگر توسط *C. chauvoei* تولید می‌گردد که خاصیت ایمنی زائی بر ضد شاربن علامتی دارند و به حرارت حساس می‌باشد (۲).

پژوهش سوشهای *C. chauvoei* جدا شده از شاربن علامتی گاو در ایران

شاربن علامتی در گاو از سال ۱۳۱۵ در دامداریهای ایران شناسائی گردیده‌است. این بیماری در دامداریهای نقاط مختلف ایران پراکنده بوده و تعداد پانزده سوش *C. chauvoei* عامل بیماری از لاشه دامهای مبتلا ونمونه‌های مرضی که از بخش پاتولوژی مؤسسه رازی به بخش تحقیق و تهیه واکسنهای بیهوازی مؤسسه رازی ارسال گردیده جدا شده‌است. نمونه‌های ارسالی از دامداریهای اطراف مؤسسه رازی حصارک، شهرهای رشت، طالش، کردان، مشهد، ممسنی، شیراز، ساوه، قزوین، گچساران، گنبدکاووس، اصفهان، تهران و سمنان بوده‌است.

مواد و روشها

جداسازی عامل بیماری

جداسازی عامل بیماری از قطعه‌ای از عضله آلوده دام مبتلا و یا استخوان قلم مورد استفاده قرار گرفته است. ابتدا از عضله مشکوک چند گسترش تهیه و پس از مشاهده باسیلهای گرم مثبت بلافاصله در روی ژلوز خوندار که تازه تهیه گردیده کشت و در جار بیهوازی گاسپاک برای مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته‌اند. سپس از دو پرگنه شبیه *C. chauvoei* انتخاب و در محیط غذائی با قطعات جگر منتقل گردیده و مجدداً در جار بیهوازی برای مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از اطمینان از خلوص باکتری، از روش رنگ‌آمیزی با سرمهای مارک‌دار استفاده گردید[1]. ابتدا سه گسترش تهیه و پس از قرار دادن گسترشها در استون به مدت ده دقیقه از سرمهای مارک‌دار *C. chauvoei*، *C. septicum*، *C. oedemacian* در روی هر یک از سه گسترش قرار داده و در یک بوات برای مدت نیم ساعت قرار گرفتند. سپس گسترشها با تامپون شستشو داده و زیر میکروسکوپ پرتوافکن (فلورسانت) مشاهده گردیده‌اند.

در این روش باکتریهای اختصاصی با سرم همولوگ شاربن علامتی برنگ سبز درخشان در زیر میکروسکوپ مشاهده گردیده‌اند. اسلایدهای منفی تاریک بوده و هیچگونه باکتری در آنها مشاهده نگردیده‌اند (۳) و کشت از مغز استخوان قلم مستقیماً در شرایط استریل در لوله آبگوشت جگر کشت و در جار بیهوازی گاسپاک به روش فوق‌الذکر باکتری جدا و مورد آزمایش قرار گرفته‌است.

پانزده سوش *C. chauvoei* که از نمونه‌های مرضی جدا گردیده بودند به روش فوق‌الذکر شناسائی و آزمایشهای مشروحه زیر در روی آنها به عمل آمده‌است.

۱- قدرت زهرابه‌زائی زهرابه آلفا:

کشت ۴۸ ساعته هر سوش در محیط غذائی تیوکلی‌کولات برای آزمایش قدرت زهرابه‌زائی سوشهای جدا شده مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا کشت در سه هزار دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و در رقت‌های $\frac{1}{10}$ $\frac{1}{20}$ $\frac{1}{30}$ $\frac{1}{40}$ و $\frac{1}{50}$ به سه موش سفید آزمایشگاهی ۱۸-۲۰ گرمی تزریق داخل وریدی به عمل آمد و نتایج به ثبت رسید.

۲- قدرت همولیز کننده سوشها:

کشت ۴۸ ساعته هر سوش در محیط غذائی تیوگلی‌کولات پس از سانتریفوژ برای آزمایش قدرت همولیز کننده سوشها مورد استفاده قرار گرفت. رقتهای تهیه شده زهرابه از ۱ تا $\frac{1}{1000}$ با سرم فیزیولوژی تهیه و در حجم یک سانتیمترمکعب در لوله‌های همولیز قرار گرفت. سپس در هر لوله یک سانتیمترمکعب از محلول یک درصد گلبولهای شسته شده اسب، گاو، گوسفند و خرگوش به ترتیب اضافه و لوله‌ها بخوبی با کاغذ غیر قابل جذب مخلوط گردیدند. همزمان در چهار لوله یک سانتیمتر مکعب از زهرابه با یک درصد گلبولهای شسته شده فوق‌الذکر و ۰/۱ سرم *C. chauvoei* اضافه و به روش فوق‌الذکر برای کنترل در هر سری رقت تهیه گردیدند. قدرت همولیز کننده سوشهای *C. chauvoei* پس از ۱۶ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفتند (۴).

۳- آزمایش نکروز کننده زهرابه آلفا:

کشت ۴۸ ساعته سوشهای *C. chauvoei* از فیلتر سایتز برای استریل نمودن زهرابه عبور داده شده و برای آزمایش قدرت نکروز کننده سوشها مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ۰/۵ سانتیمترمکعب زهرابه و ۰/۲ سانتیمترمکعب سرم فیزیولوژی و ۰/۱ سانتیمترمکعب سرم اختصاصی *C. chauvoei* مخلوط گردیدند. همچنین ۰/۵ سانتیمترمکعب زهرابه و ۰/۳ سانتیمترمکعب سرم فیزیولوژی مخلوط و تمام لوله‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه نگهداری گردیدند. محتوی لوله‌ها در دو طرف شکم خوکچه هندی که قبلاً پشم آن چیده و با تیغ تمیز شده‌بودند به مقدار ۰/۲ سانتیمترمکعب تزریق بین جلدی به عمل آمد و نتایج آزمایش ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد مشاهده گردید.

۴- حساسیت سوشهای *C. chauvoei* به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف:

پانزده نوع دیسک آنتی‌بیوتیک مختلف کارخانه دیفکو بنامهای تتراسیکلین، پنی‌سیلین، ارگومایسین، آمپی‌سیلین، دوکسی‌سیکلین هیدروکلراید، اریترومایسین، نووبیوسین، نئومایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل، استرپتومایسین، کلیستین، و انکومایسین، الکوزین و دی‌هیدرواسترپتومایسین برای آزمایش حساسیت سوشهای جدا شده انتخاب گردیدند.

برای آزمایش حساسیت سوشها به آنتی‌بیوتیکهای فوق‌الذکر آگار جگر و گوشت (Viand و Foie) تازه تهیه شده انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. هر سوش *C. chauvoei* در محیط غذائی جگر و گوشت به مدت ۲۴ ساعت در جار بیهوازی کشت و سپس در سطح آگار محیط جگر و گوشت تازه تهیه شده به طور یکنواخت پخش و در هر بوات سه نوع دیسک آنتی‌بیوتیک مختلف با فاصله مساوی قرار گرفت. بوات‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها در جار بیهوازی گاسپاک برای مدت ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. حساسیت هر دیسک آنتی‌بیوتیک برای هر سوش *C. chauvoei* بوسیله کولیس اندازه‌گیری گردید.

نتایج

پانزده سوش *C. chauvoei* عامل شاربن علامتی گاو از عضله و مغز استخوان مشکوک به شاربن علامتی از نقاط مختلف ایران جدا گردید. برای تشخیص قطعی باکتری سرمهای اختصاصی *C. chauvoei* و با استفاده از میکروسکوپ پرتوافکن باکتریهای جدا شده مورد تأیید قرار گرفت.

قدرت زهرابه سوشهای جدا شده بین ۵ تا ۲۰ دُز کشنده در سانتیمترمکعب برای موش سفید آزمایشگاهی بوده‌است. نکروز قابل ملاحظه‌ای در پوست خوکچه‌های تزریقی مشاهده نگردید. قدرت همولیز زهرابه‌ها برای گویچه‌های قرمز خون گاو قویتر از همولیز گویچه‌های قرمز گوسفند، خرگوش و اسب بوده است که در جدول شماره ۱ خلاصه گردیده‌است. نتیجه آزمایش حساسیت سوشهای جدا شده به آنتی‌بیوتیک‌ها ثابت نمود که تمام سوشها بیشتر به تتراسیکلین، اریترومایسین، پنی‌سیلین، ارگومایسین و آمپی‌سیلین حساس می‌باشند ولی به آنتی بیوتیک‌های دیگر کمتر حساس بوده و یا مقاوم بوده‌اند.

بحث

شاربن علامتی یکی از بیماریهای شناخته شده گاو در دامپروریهای ایران می‌باشد. شناسائی بیماری علاوه بر تظاهرات علائم کلینیکی، تشخیص سریع عامل بیماری با استفاده از روش سرم‌های اختصاصی و *C. chauvoei* میکروسکوپ پرتوافکن سریعاً امکان‌پذیر می‌باشد. تشخیص تفریقی *C. chauvoei* از *C. septicum* که بیشتر در اورام بدخیم در گاو دخالت دارد حائز اهمیت است.

در دامداریها گاوهای مبتلا به شاربن علامتی را می‌توان در ابتدای ظهور علائم بیماری با استفاه از آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر درمان نمود، در این پژوهش مشخص گردیده که سوشهای *C. chauvoei* جدا شده به آنتی‌بیوتیک‌هائی مانند پنی‌سیلین، تتراسیکلین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین نسبت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت بیشتری دارند. آزمایشهائی که در این پژوهش به عمل آمده نشانگر آن است که زهرابه آلفای *C. chauvoei* دارای قدرت همولیزکننده قوی مخصوصاً در گلبولهای قرمز خون گاو و گوسفند می‌باشد. قدرت زهرابه‌زائی و نکروزکننده سوشهای جدا شده در موش سفید آزمایشگاهی و خوکچه هندی با مقایسه با زهرابه سایر کلستریدیومها مانند کلستریدیوم *C. butulinum*، *C. oedemician*، *C. perfringens* کمتر می‌باشد.

پاورقی

1- Fluorescent Antibodies, Clostridium species, Wellcome Research Laboratories, England.

منابع مورد استفاده

1- Ardehali, M., Khalili, KH and Dowran, H. 1971. Characterization of *Clostridium chauvei* starins isolated from an outbreak of blackleg in Iran. Areh. Inst. Razi 1971, 23 - 119-123.

2- Louis Ds. Smith and Betsy L. Williams. 1986. The pathogenic anaerobic bacteria, chapter 10, *Clostridium chauroei*, Charles Themas Publisher, Spring field, U.S.A.

3- Sterne, M. Batty I. 1975. Differentiation of *C. septicum* and *C. Chauvoei* by the use of fluorescent labelled antibodies. Butterworth Publisher, Landon.

4- Jain, UC. Tanwani, Sk, Moghe, Mn, 1990. Studies on characterization of hemolysins produced by *C. chauvoei*, Indian veterinary journal. 7: 2, 94-102.

5- Hatheway, Cl. 1990, Taxigenic clostridia, Clinical Microliology, Reviews B: 1, 66-98.

جدول شماره ۱- قدرت همولیز کنده زهرابه‌ها در قسمتهای مختلف

تعداد سوشها	نوع گلبول قرمز	۱	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$
۱۵	گاو	++	++	++	++	++	++	++	+	-
۱۵	گوسفند	++	++	++	++	++	+	-	-	-
۱۵	خرگوش	++	++	++	++	+	-	-	-	-
۱۵	اسب	++	++	++	+	-	-	-	-	-

++ = همولیزکامل، + = همولیز ناقص، - = بدون همولیز

جدول شماره ۲- حساسیت سوشهای *C. chauvoei* بر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

تعداد سوشها	نوع آنتی‌بیوتیک	قدرت حساسیت
۳	پنی‌سیلین	+++
۳	تتراسیکلین	+++
۳	آمپی‌سیلین	+++
۳	اریترومایسین	+++
۳	ارگومایسین	+++
۳	فوراسین	++
۳	وانکومایسین	++
۳	ارثومایسین	++
۳	نئومایسین	++
۳	الکوزین	--
۳	استرپتومایسین	--
۳	کلیستین	--
۳	اولاندومایسین	--
۳	دوکسی سیکلین هیدروکلراید	--
۳	دی هیدرواستریتومایسین	--