Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 1 (06-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Toxinotyping of *Clostridium perfringens* Strains Isolated from Packed Chicken Portions

Maryam Poursoltani[1], Mohammad Mohsenzadeh[1], Jamshid Razmyar[2], Seyed Mostafa Peighambari[3]

1. Department of Food hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received:2014/04/01
Accepted:2014/06/20
Available online:2014/05/05

Article Subject:
Molecular Microbiology

IJMM 1393; 8(1): P 9-17

Corresponding author at:

Dr.Mohammad Mohsenzadeh

Department of Food hygiene and Aquaculture, Faculty of veterinary medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Email:
mohsenza@um.ac.ir

Abstract

Background and Aim: *Clostridium perfringens* are classified into five toxin types A to E, on the basis of production of Alpha, Beta, Epsilon and Iota toxins. Some strains are able to produce enterotoxin, can cause food poisoning in human. The bacteria are able to produce *netB* and TpeL toxins which are virulence factors in necrotic enteritis in poultry. The aim of this study was to determine the toxin profile of *C. perfringens* strains isolated from packed chicken portions using Single and Multiplex PCR assays.

Materials and Methods: In a crossectional study, 180 sample of chicken portions including wing (n=50), liver (n=50), neck (n=50) and gizzard (n=30) were collected randomly and examined for *C. perfringens* contamination. For this purpose all of samples were cultured on the 7% sheep defibrinated blood agar, TSN and TSC culture media. All of the isolates were investigated for the presence of alpha, beta, epsilon, iota toxin and virulence (*tpeL* and *netB*) genes.

Results: In the present study, 6 isolates out of 180 samples, were confirmed as *C. perfringens* by culture and molecular methods. All of the isolates (100%) were confirmed as *cpa* and *cpb* positive strains and belong to type C of *C. perfringens*. The *netB* gene was detected in 5 isolates (83.33%) and *tpeL* gene in three isolates (50%).

Conclusions: Our findings show the majority of *C. perfringens* in broilers are belong to type C which produce necrotic enteritis in poultry and may be transmitted to human through poultry products.

Key Words: *C. perfringens, Toxins, Broilers, PCR*

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Poursoltani M, Mohsenzadeh M, Razmyar J, Peighambari S. Toxinotyping of *Clostridium perfringens* strains isolated from packed chicken portions. Iranian J Med Microbiology . 2014; 8 (1) :9-17

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

تعیین تیپ توکسینی *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از قطعات بسته بندی شده مرغ گوشتی

مریم پورسلطانی[۱]، محمد محسن زاده[۱]، جمشید رزم یار[۲]، سید مصطفی پیغمبری[۳]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. گروه بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۲/۲۰

پذیرش:۱۳۹۳/۰۳/۱۵

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۳/۲۰

موضوع:

میکروب شناسی مولکولی

IJMM 1392; 8(1): P 9-17

نویسنده مسئول:

دکتر محمد محسن زاده

دانشیارگروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تلفن: ۰۹۱۵۳۱۳۸۹۵۵

پست الکترونیک:

mohsenza@um.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* برمبنای تولید سموم آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به پنج تیپ A تا E طبقه بندی می شود. بعضی از سویه های این باکتری قادر به تولید انتروتوکسین بوده که می تواند باعث مسمومیت غذایی در انسان شود. علاوه بر این، توکسین‌های دیگری همچون *netB* و *tpeL* که اخیرابه عنوان عوامل حدت *کلستریدیوم پرفرینجنس* در بیماری‌های طیور مطرح شده اند، ممکن است در انسان نیز در تشدید علائم مسمومیت غذایی موثر باشند. هدف از این مطالعه تعیین پروفایل توکسینی *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از نمونه های قطعات بسته بندی شده مرغ گوشتی با استفاده از روش‌های Single و Multiplex PCR می باشد.

مواد و روش کار: در یک مطالعه مقطعی تعداد ۱۸۰ نمونه قطعه بسته بندی شده مرغ گوشتی شامل گردن، بال و کبد (هر کدام ۵۰ نمونه) و سنگدان (۳۰ نمونه) به طور تصادفی جمع آوری و از بابت آلودگی به *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور نمونه ها برروی محیط های آگار حاوی ۷٪ خون دفیبرینه گوسفند، TSNو TSC کشت گردیدند. جدایه های بدست آمده از بابت حضور ژن های مسئول تولید توکسین (آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) و ژن های حدت (*tpeL* و *netB*) به روش PCR تعیین تیپ گردیدند.

یافته‌ها: در این مطالعه از کل نمونه‌های مورد بررسی تعداد ٦ جدایه به عنوان *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد تایید قرار گرفتند که درتمامی جدایه‌ها (۱۰۰٪) ژن های *cpa* و *cpb*، شناسایی گردید. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که کلیه جدایه‌ها به تیپ *C کلستریدیوم پرفرینجنس* تعلق دارند. در۵ جدایه (۸۳,۳۳٪) ژن *netB* و در ۳ جدایه (۵۰٪) ژن *tpeL* شناسایی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ممکن است تیپ های توکسین زای *کلستریدیوم پرفرینجنس* که واجد ژن های عوامل حدت باکتری چون *netB* که در ایجاد انتریت نکروتیک در طیورنقش دارند از طریق مرغ و فرآورده های طیور به انسان انتقال یابند.

کلمات کلیدی : *کلستریدیوم پرفرینجنس*، توکسین، مرغ گوشتی، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* علاوه بر اینکه به طور بسیار گسترده‌ای در خاک و محیط وجود دارد، به عنوان جزئی از فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و تقریبا تمام حیوانات خونگرم نیز می باشد. این باکتری تحت شرایط خاصی می‌تواند به عنوان یک پاتوژن عمل نماید. حدت بیماریزایی این باکتری به خاطر تولید حداقل ۱۵ نوع توکسین می باشد. (۱). آنتروتوکسین ناشی از *کلستریدیوم پرفرینجنس* به عنوان یک عامل شایع مسمومیت غذایی در انسان می باشد به طوری که در آمریکا و انگلیس به عنوان سومین عامل شایع در ایجاد مسمومیت غذایی شناخته شده است (۲). فراورده های طیور به لحاظ مصرف وسیع آن در ایران می توانند یکی از راه های انتقال این باکتری به انسان

باشند. به لحاظ وجود گزارشات مختلف (۴،۳) از آلودگی مرغ و فرآورده های آن به *کلستریدیوم پرفرینجنس* توکسین زا و مقاوم به آنتی بیوتیک امکان انتقال این باکتری به انسان و ایجاد مسمومیت های غذایی و اسهال های مقاوم به آنتی بیوتیک وجود دارد. همچنین این باکتری در ایجاد گانگرن گازی در انسان دخالت دارد. در طیور نیز می تواند هم به شکل بالینی و هم تحت بالینی ایجاد بیماری نماید (۵،۶).

در گذشته تعیین تیپ‌های باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر اساس روش خنثی‌سازی سرم در خوکچه‌ی هندی و یا موش صورت می‌گرفت. در این روش به آنتی‌سرم‌های مختلف نیاز می‌باشد، که تهیه‌ی آنها مشکلات خاص خودش را داشت. امروزه به علت زمان بر بودن، صرف هزینه‌ی زیاد و مسائل مربوط به حقوق حیوانات، از روش‌های مولکولی در تعیین تیپ این باکتری استفاده می شود. باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر اساس توانایی تولید ۴ نوع توکسین اصلی به نام های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به ۵ تیپ A تا E طبقه‌بندی می‌شوند. تیپ A فقط توانایی تولید آلفا توکسین را دارد؛ در حالیکه تیپ B توکسین های آلفا، بتا و اپسیلون را تولید می کند. تیپ C توانایی تولید توکسین های آلفا و بتا، تیپ D، آلفا و اپسیلون و تیپ E نیز توکسین های آلفا و یوتا را تولید می کند. علاوه بر توکسین های اصلی ذکر شده در بالا، سویه های این باکتری توانایی تولید حداقل ۱۵ نوع توکسین و آنزیم خارج سلولی دیگر از جمله انتروتوکسین و *netB* را دارا می باشند (۷). جایگاه هر کدام از این ژن‌های مولد توکسین و نحوه‌ی عملکرد آن‌ها در سلول، متفاوت می‌باشد. برخی ژن‌های مولد توکسین مثل ژن آلفا توکسین، *plc* یا *cpa*، بر روی کروموزوم قرار دارند در حالی که برخی دیگر مثل ژن‌های توکسین بتا (*cpb*) و یا اپسیلون (*etx*) بر روی پلاسمید واقع شده اند. ژن انتروتوکسین (*cpe*) می‌تواند هم بر روی کروموزوم و هم بر روی پلاسمید قرار گیرد. به غیر از توکسین یوتا که از طریق فعال کردن واکنش‌های داخل سلولی اثرات خود را می‌گذارد، بقیه‌ی توکسین‌ها از طریق تاثیر بر غشاهای سلولی نقش خود را ایفا می‌نمایند (۱). اخیرا یک توکسین جدید به نام *netB*، توسط Keyburn و همکاران (۲۰۰۸) در استرالیا کشف گردید. آنها این توکسین را در یک سویه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A که از یک مرغ مبتلا به بیماری انتریت نکروتیک جدا شده بود، تشخیص دادند (۸). آنها در مطالعه دیگری نشان دادند که بر خلاف تصورات اولیه، توکسین آلفا برای ایجاد بیماری آنتریت نکروتیک عاملی ضروری نمی‌باشد (۹). Martin و Smyth (۲۰۰۹)، در مطالعه‌ای نشان دادند که ژن *netB* در ۵۸٫۳٪ سویه های جدا شده از مرغان مبتلا به آنتریت نکروتیک شناسایی شد در حالیکه تنها درصد اندکی از جدایه های بدست آمده از مرغان سالم (۸/۶٪) این ژن را داشتند (۱۰). Amimoto و همکاران (۲۰۰۷) درمطالعه‌ای درژاپن یک توکسین جدید به نامتوکسین (*tpeL*) را دریک سویه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C تشخیص دادند (۱۱). Nagahama و همکاران (۲۰۱۱) این ژن را در نمونه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A نیز بررسی کردند (۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد که توکسین *tpeL* علاوه بر نقش اصلی در ایجاد بیماری انتریت نکروتیک طیور باعث تشدید روند بیماری‌زایی نیز می‌شود.

از آنجایی که تیپ‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* در حیوانات مختلف و همچنین در انسان، بیماری-های متفاوت و گوناگونی را سبب می‌گردند؛ لذا تعیین تیپ این باکتری به منظور فهمیدن عامل مسبب بیماری و همچنین بررسی‌های اپیدمیولوژیکی، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین این مطالعه با هدف تعیین تیپ مولکولی سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از قسمت های بسته بندی شده مرغ گوشتی در استان خراسان رضوی و همچنین ردیابی ژن های جدید *tpeL* و *netB* در جدایه‌های بدست آمده انجام گردید.

مواد و روش‌ها:

سویه های باکتریایی

در یک مطالعه مقطعی طی سال ۱۳۹۱ تعداد ۱۸۰ نمونه قطعه بسته بندی شده مرغ گوشتی شامل گردن، بال و کبد (هر کدام ۵۰ نمونه) و سنگدان (۳۰ نمونه) از مراکز عرضه در مشهد، استان خراسان رضوی به طور تصادفی جمع آوری و از بابت آلودگی به *کلستریدیوم پرفرینجنس*، با استفاده از روش FDA (۲۰۰۱) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۳). بدین منظور ۱۰ گرم ازهر یک از نمونه ها با ۹۰ میلی لیتر محیط کشت آب پپتونه کاملا هموژن گردید. سپس به دو لوله حاوی ۹ میلی لیترمحیط کشت مایع تیوگلیکولات (FTG, HiMedia) و به هر کدام مقدار ۱میلی لیتر از از نمونه هموژن شده اضافه گردید. یکی از این دو لوله را در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۲۰ دقیقه شوک حرارتی داده و لوله ها برای ۱۸ تا ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و در شرایط بی

هوازی گرمخانه گذاری گردیدند. بعد از غنی سازی اولیه برای *کلستریدیوم پرفرینجنس*، از هر کدام از لوله ها بر روی محیط کشت آگار خوندار حاوی ۷٪ خون دفیبرینه‌ی گوسفند به صورت خطی کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری گردید. برای تایید تشخیص باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده، از هریک از پرگنه های واجد همولیز دوگانه روی محیط آگار خوندار، بر روی محیط کشت آگار سیکلوسرین تریپتوز سولفیت (TSC, HiMedia) و آگار نئومایسین تریپتون سولفیت (TSN, HiMedia) کشت گردید. پلیت های فوق در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری گردیدند. جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* تایید شده در محیط کشت مایع قلب-مغز همراه با گلیسرول در ۲۰- درجه سلسیوس تا انجام آزمایشات مولکولی نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی

به منظور استخراج DNA ژنومی، از پرگنه های خالص رشد یافته بر روی محیط کشت آگار نئومایسین تریپتون سولفیت (TSN) برداشته و در ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات نمکی (PBS) مخلوط شدند. سوسپانسیون بدست آمده در ۱۴۰۰۰ ×g برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب بدست آمده دو مرتبه با محلول PBS شستشو گردید. سپس مجددا سوسپانسیون تهیه شد و با استفاده ازکیت استخراج DNA (AccuPrep®, Bioneer, Korea) و بر اساس توصیه کارخانه سازنده، استخراج DNA انجام گرفت .

تعیین پروفایل توکسینی جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* به روش Multiplex PCR

آزمایش Multiplex PCR در مطالعه حاضر بر اساس روش ارائه شده توسط Uzal و Songer (۲۰۰۸) انجام گردید (۱۴). توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده، در جدول شماره ی ۱ نشان داده شده است. مخلوط واکنش مولتی پلکس PCR در دستگاه ترمال سایکلر (Techne, England) با برنامه حرارتی زیر: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، هیبرید شدن آغازگرها در۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و بسط DNA در۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، قرار داده شد. مشخصات مخلوط واکنش Multiplex PCR در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. سویه های CIP106157 *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ A واجد ژن انتروتوکسین (*cpa+, cpe+*) و CIP6061 *کلستریدیوم پرفرنجنس* تیپ B واجد ژن بتا ۲مثبت (*cpa+, cpb+, etx+, cpb2+*) تهیه شده از انستیتو پاستور به عنوان کنترل مثبت در آزمایش Multiplex PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱: مشخصات مواد مخلوط واکنش Multiplex PCR

مواد و غلظت مورد نیاز	**حجم مورد نیاز (میکرولیتر)**
بافر 10X PCR	۵
MgCl (۵۰ Mm)	۲
dNTPs (۱۰ Mm)	۰/۶
پرایمر Cpa (رفت و برگشت، ۱۰ Pm)	۲/۵ × ۲
پرایمر Cpb (رفت و برگشت، ۱۰ Pm)	۱/۸ × ۲
پرایمر Etx (رفت و برگشت، ۱۰ Pm)	۲/۲ × ۲
پرایمر ItxA (رفت و برگشت، ۱۰ Pm)	۲/۶ × ۲
پرایمر Cpe (رفت و برگشت، ۱۰ Pm)	۱/۷ ×۲
پرایمر Cpb2 (رفت و برگشت، ۱۰ Pm)	۱/۸ × ۲
آب مقطر دوبار تقطیر	۶/۲
Taq DNA Polymerase (۵ U/µl)	۱
الگوی DNA	۱۰
کل	۵۰ میکرولیتر

انجام Single PCR جهت تشخیص ژن *netB*

بدین منظور از یک جفت آغازگر به نامهای AKP78 به عنوان آغازگر پیشین و AKP79 به عنوان آغازگر پسین که قبلا توسط Keyburn و همکاران (۲۰۰۸) توصیف شده بود، استفاده گردید (۸). توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در جدول۱ نشان داده شده است. جهت تشخیص ژن *netB*، مخلوط اصلی واکنش PCR در حجم۵۰ میکرولیتر تهیه گردید (جدول ۳). برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی برای انجام Single PCR جهت شناسایی ژن*netB* ، شامل: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه. ۳۵ سیکل شامل واسرشته سازی در دمای۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، هیبرید شدن آغازگرها در ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و بسط DNA در۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه. پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲دقیقه بود. از سویه JRMTK01

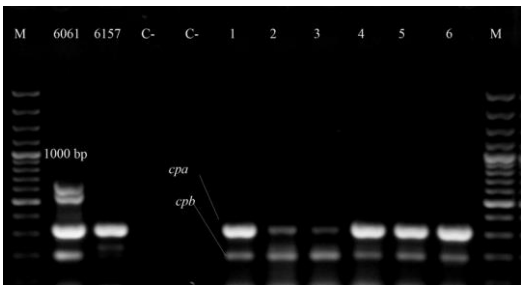
کلستریدیوم پرفرینجنس به عنوان کنترل مثبت ژن *netB* استفاده گردید.

جدول ۲: مشخصات مواد مخلوط واکنش Single PCR

مواد و غلظت مورد نیاز	حجم مورد نیاز (میکرولیتر)
بافر 10X PCR	۳،۴۵
MgCl (۵۰ Mm)	۲،۵
dNTPs (۱۰ Mm)	۱
پرایمر (رفت و برگشت، ۱۰ Pm)	۲× ۰،۵
آب مقطر دوبار تقطیر	۳۱،۰۵
Taq DNA Polymerase (۵ U/µl)	۱
الگوی DNA	۱۰
کل	۵۰ میکرولیتر

انجام Single PCR جهت تشخیص ژن *tpeL*

بدین منظور از آغازگرهای توصیف شده به وسیله Coursodon و همکاران (۲۰۱۲) استفاده گردید (**۱۵**). توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در جدول۱ آمده است. برنامه ی چرخه‌ی حرارتی جهت شناسایی ژن *tpeL* شامل: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واسرشته سازی در دمای۹۴ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه، هیبرید شدن آغازگرها در۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و بسط DNA در۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه و پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه بود. مشخصات مخلوط واکنش PCR مورد استفاده در جدول ۳ نشان داده شده است. محصولات بدست آمده در کلیه ی آزمایشات PCR این تحقیق برروی ژل آگارز ۱/۵٪ با ولتاژ v/cm ۵ رانده شد و باندهای تشکیل شده در UV Transillumination (Padideh Nojen Pars, Iran) بررسی گردید. از سویه JRTK01 *کلستریدیوم پرفرینجنس* واجد ژن tpeL به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.



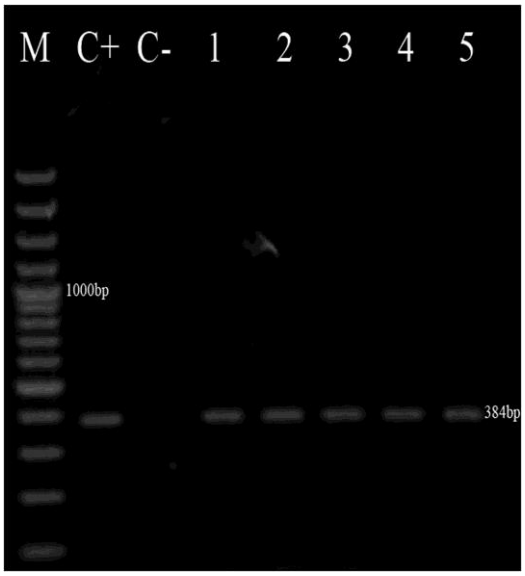
شکل ۱: الکتروفورز محصولات حاصل از Multiplex PCR جدایه‌های کلستریدیوم پرفرینجنس بر روی ژل آگارز ۱،۵ درصد. M: مارکر مولکولی ۱۰۰bp ; ۶۰۶۱: سویه CIP6061 کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ B واجد ژن های cpa، cpb، cpb2 و etx ۶۱۵۷: سویه CIP106157 کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ A واجد ژن های cpa و cpe ، C- : کنترل منفی (کلستریدیوم دیفیسیل) ; C- : کنترل منفی (سرم فیزیولوژی) و ۱-۶ : کلستریدیوم پرفرینجنس جداشده از نمونه‌ها که واجد ژن های cpa (۳۲۴bp) و cpb (۱۹۶bp) می باشند.

جدول ۳: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در آزمایشات مختلف Multiplex PCR و Single PCR

ژن هدف	توالی نوکلئوتیدی	(bp)	روش PCR	منبع
cpa	5’-GCTAATGTTACTGCCGTTGA-3’ 5’-CCTCTGATACATCGTGTAAG-3’	۳۲۴	Multiplex PCR	۱۴
cpb	5’-GCGAATATGCTGAATCATCTA-3’ 5’-GCAGGAACATTAGTATATCTTC-3’	۱۹۶	Multiplex PCR	۱۴
etx	5’-GCGGTGATATCCATCTATTC-3’ 5’-CCACTTACTTGTCCTACTAAC-3’	۶۵۵	Multiplex PCR	۱۴
itxA	5’-ACTACTCTCAGACAAGACAG-3’ 5’-CTTTCCTTCTATTACTATACG-3’	۴۴۶	Multiplex PCR	۱۴
cpe	5’-GGAGATGGTTGGATATTAGG-3’ 5’-GGACCAGCAGTTGTAGATA-3’	۲۳۳	Multiplex PCR	۱۴
cpb2	5’-AGATTTTAAATATGATCCTAACC-3’ 5’-CAATACCCTTCACCAAATACTC-3’	۵۶۷	Multiplex PCR	۱۴
netB	5’-GCTGGTGCTGGAATAAATGC-3’ 5’-TCGCCATTGAGTAGTTTCCC-3’	۳۸۴	Single PCR	۸
tpeL	5’-ATATAGAGTCAAGCAGTGGAG-3’ 5’-GGAATACCACTTGATATACCTG-3’	۴۶۶	Single PCR	۱۵

جدول ۴: نتایج آزمایش مولتی پلکس PCR جهت ردیابی ۶ ژن مولد توکسین وتعیین تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از قطعات مرغ گوشتی بسته بندی شده

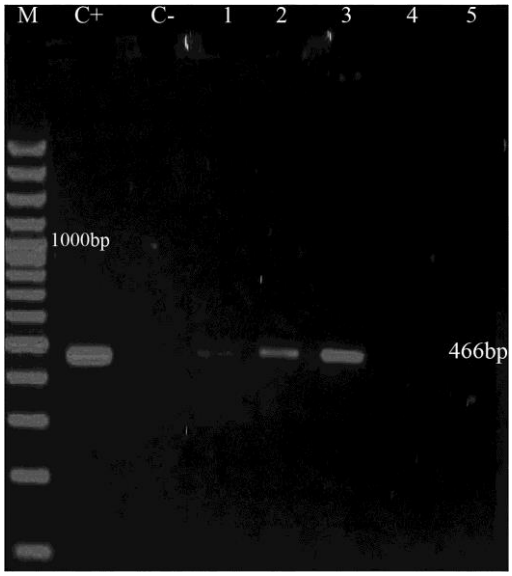
نمونه	پروفایل توکسینی						تیپ *کلستریدیوم پرفرینجنس*
	آلفا (*cpa*)	بتا (*cpb*)	یوتا (*itxA*)	اپسیلون (*etx*)	*Cpb2*	انتروتوکسین (*cpe*)	
گردن	+	+	–	–	–	–	تیپ C
بال	+	+	–	–	–	–	تیپ C
سنگدان	+	+	–	–	–	–	تیپ C
کبد	+	+	–	–	–	–	تیپ C



شکل ۲: الکتروفورز محصولات حاصل از Single PCR جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در ارتباط با ژن netB. M: مارکر مولکولی ۱۰۰bp؛ C+: سویه *کلستریدیوم پرفرینجنس* JRMTK01 واجد ژن netB ، C-: کنترل منفی (فاقد DNA ژنومی)؛ ۱ و ۲: جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه های بال؛ ۳: جدایه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه ی گردن؛ ۴ و ۵: جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه های کبد.

یافته ها

در این مطالعه تعداد ۶ سویه (۳/۳۳٪) *کلستریدیوم پرفرینجنس* از مجموع ۱۸۰ نمونه قطعات بسته بندی شده مرغ گوشتی جداسازی گردید. هر بافت مورد بررسی در این تحقیق به یک پرنده تعلق داشت. کلیه جدایه ها از میان ۴ ژن مسئول تولید توکسین‌های اصلی فقط از بابت ژن های *cpa* و *cpb* مثبت بودند و سایر ژن‌های اصلی (*itxA* و *etx*) در آن‌ها یافت نگردید (شکل ۱ و جدول ۴). بنابراین تمامی جدایه ها به تیپ C *کلستریدیوم پرفرینجنس* تعلق دارند. همچنین تمامی جدایه‌های باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* در ارتباط با ژن *cpe* منفی بودند. همچنین از میان۶ سویه باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده، ۵ جدایه (۸۳/۳۳٪) در ارتباط با ژن *netB* مثبت و تنها یک جدایه منفی بود (شکل ۲). در ارتباط با حضور ژن *tpeL* نیز از میان۶ سویه ی باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه های بال، گردن، کبد و سنگدان مرغ، ۳جدایه (۵۰٪) مثبت و ۳ جدایه منفی بود (شکل ۳).



شکل ۳: الکتروفورز محصولات حاصل از Single PCR جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در ارتباط با ژن tpeL M؛ مارکر مولکولی bp100، C+: سویه کلستریدیوم پرفرینجنسJRTK01 واجد ژن tpeL، C-: کنترل منفی(فاقد DNA ژنومی)؛ ۱ و ۲: جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه های بال؛ ۳: جدایه‌ی *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه‌ی گردن؛ ۴ و ۵: جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه های کبد.

بحث

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در رابطه با جداسازی، تعیین تیپ مولکولی، بررسی ژن‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* در موارد ابتلای طیور با بیماری انتریت نکروتیک انجام شده است؛ اما در ارتباط با جداسازی و تعیین تیپ مولکولی *کلستریدیوم پرفرینجنس* موجود در مواد غذایی و فراورده های غذایی طیور، مطالعات بسیار محدودی انجام شده است.

تیپ‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس*، باعث ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و حیوانات می شود. یکی از بیماری‌های مهمی که باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* در انسان ایجاد می‌کند، مسمومیت غذایی می‌باشد که امروزه توجه ویژه‌ای به آن درسطح جهان می‌شود. سالیانه عده‌ی بسیار زیادی از انسان‌ها درسراسر جهان دچار مسمومیت غذایی می‌شوند که یکی از علل مهم آن مسمومیت غذایی با باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* می‌باشد. درسال‌های اخیر آمار بسیار متفاوتی در مورد شیوع مسمومیت غذایی با باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* در کشورهای مختلف وجود دارد، اما متاسفانه هیچ‌گونه آماری در مورد مسمومیت غذایی این باکتری و میزان رخداد آن در ایران، وجود ندارد. دلایل مختلفی در مورد عدم وجود آمار دقیق مسمومیت غذایی با باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* وجود دارد که از آن جمله می‌توان به عدم ثبت اطلاعات کافی در مورد بیماران مراجعه کننده به بیمارستان‌ها با علائم مسمومیت غذایی، عدم پیگیری بهبود یا عدم بهبود علائم مسمومیت غذایی در بیماران پس از مراجعه، عدم تحقیقات و مطالعات کافی در مورد انواع مسمومیت های غذایی و نحوه‌ی ایجاد آن‌ها در ایران اشاره کرد. مهم‌ترین دلیلی که می‌توان در مورد عدم تحقیقات لازم در مورد *کلستریدیوم پرفرینجنس* و مسمومیت‌های غذایی ناشی از آن نام برد، در مورد کشت باکتری می باشد.

Brynestad و Granum (۲۰۰۲) طی مطالعه‌ای به بررسی نحوه ی ایجاد مسمومیت غذایی توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A و C پرداختند. مسمومیت غذایی ایجاد شده توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A دراغلب نقاط دنیا بسیار شایع می باشد؛ اما این نوع مسمومیت غذایی اغلب پس از ۲۴ ساعت خود به خود بهبود پیدا می کند. مسمومیت غذایی با *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C بسیار محدود اما کشنده می باشد به طوری که در طی ۱۰ سال اخیر هیچ گونه گزارشی درمورد این نوع مسمومیت غذایی داده نشده است. حدود چندسال پس از جنگ جهانی دوم یک شیوع بسیار شدید مسمومیت غذایی در اروپا اتفاق افتادکه عامل آن *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C بود. مسمومیت غذایی با *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C بسیار خطرناک می‌باشد. به طوری‌که حتی اگر درمان صورت بگیرد ۱۵٪-۲۵٪ احتمال مرگ و میر وجود دارد (**۲**).

امروزه برای تعیین تیپ جدایه‌های مختلف باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* از روش مولکولی Multiplex PCR به جای روش سنتی خنثی‌سازی سرم در موش یا خوکچه‌ی هندی استفاده می شود که روشی راحت و قابل اطمینان می باشد. برخی از سویه‌ها با روش قدیمی قابلیت تایپینگ ندارند و یا میزان تولید توکسین آن‌ها به آن اندازه نمی‌باشد که بتوان با خنثی سازی سرم مشخص نمود. از طرفی باید در نظر داشت که در روش مولکولی، تنها حضور ژن‌های مولد توکسین مورد بررسی قرار می گیرد و توانایی تولید توکسین مشخص نمی باشد. مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه در ایران است که به بررسی میزان آلودگی فراورده‌های مرغ به باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* با استفاده از روش های کشت آزمایشگاهی، Multiplex PCR (برای تشخیص ژن‌های *cpa*، *cpb*، *etx*، *itxA*، *cpe*، *cpb2*، و Single PCR (برای ژن های *netB* و *tpeL*) می پردازد. Meer و Songer (۱۹۹۷) در مطالعه ایی که بر روی ۸۸ جدایه *کلستریدیوم پرفرینجنس* از طریق مقایسه‌ی فنوتیپ به روش خنثی سازی سرم و ژنوتیپ به روش Multiplex PCR، انجام دادند نشان دادند که ۹۹٪ بین فنوتیپ و ژنوتیپ جدایه ها ارتباط وجود دارد. یعنی در ارتباط با ژن‌های اصلی ۹۹٪ حضور ژن با تولید توکسین همراه خواهد بود (**۱۶**). البته روش‌های مولکولی دیگری نیز علاوه بر Multiplex PCR برای تعیین ژنوتیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* به کار گرفته شده است؛ اما روش Multiplex PCR بسیار کاربردی و قابل انجام در اکثر آزمایشگاه های تشخیصی می باشد. Al-Khaldi و همکاران (۲۰۰۴) از Real-time Multiplex PCR برای جداسازی سریع و تعیین تیپ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* موجود در مدفوع گاوهای شیری استفاده نمودند (**۱۷**).

در مطالعه حاضرکلیه ی سویه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از نمونه های قطعات بسته بندی شده مرغ گوشتی با استفاده از روش Multiplex PCR به عنوان *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C تشخیص داده شدند. همچنین آزمایشات جداگانه Single PCR برای ژن *netB* و *tpeL* انجام شد که در۸۸/۳۳٪ جدایه ها ژن *netB* و در۵۰٪ جدایه ها ژن *tpeL* شناسایی گردید. در مطالعه‌ای مشابه که توسط Nowell و همکاران (۲۰۱۰)، انجام شد تعداد ۶۴ عدد بال و پای مرغ به صورت تازه و تصادفی جمع آوری گردید. پس از جداسازی باکتری، آزمایش PCR به طور جداگانه برای هر یک از ژن‌های *cpa*، *cpb2*، *cpe*، *netB*، و *tpeL* انجام شد. از مجموع ۶۴ نمونه‌ی مورد بررسی در این مطالعه، از ۴۲ نمونه (۶۶٪) *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداسازی شد. در هیچ یک از این جدایه ها ژن *cpe* یافت نشد. در این مطالعه ژن *netB* در۲۱٪ و ژن *tpeL* در ۱/۶٪ جدایه‌ها شناسایی شد. در ۵۱٪ از جدایه ها، ژن *cpb2* تشخیص داده شد (**۱۸**). مطالعه حاضر از چند جهت با مطالعه‌ی Nowell و همکاران (۲۰۱۰) متفاوت می‌باشد. اولاً این که در مطالعه ایشان تنها حضور ژن *cpa* درآزمایش PCR، جهت تشخیص *کلستریدیوم پرفرینجنس* مورد بررسی قرارگرفت و حضور سایر ژنهای *cpb, itxA* و*etx* برای تعیین نوع *کلستریدیوم پرفرینجنس* در جدایه ها مورد بررسی قرار نگرفت. در حالی که در مطالعه‌ی حاضر حضورژن های *cpa*، *cpb*، *itxA* و *etx* مورد مطالعه قرار گرفت که در نهایت تمام جدایه‌های بدست آمده دارای ژن *cpa* و*cpb* بودند و به عنوان *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ C شناخته شدند. علاوه براین درمطالعه ی Nowell و همکاران (۲۰۱۰) علاوه بر نمونه های تازه تعداد ۲۴ نمونه نیزبه صورت منجمد جمع‌آوری گردید که از ۱۶ نمونه (۶۷٪) *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداسازی شد و نتایج حاصل با یکدیگر مقایسه گردید.

در سال‌های اخیر دو توکسین جدید به نام‌های netB و tpeL کشف گردیده که مطالعات بسیاری در رابطه با جداسازی این دو توکسین از طیور و نقش آن‌ها در ایجاد بیماری انتریت نکروتیک انجام شده است (**۲۰،۱۹،۱۵**)؛ اما مطالعه‌ای در مورد نقش این دو توکسین در ایجاد مسمومیت غذایی با *کلستریدیوم پرفرینجنس* انجام نشده است. تا مدت‌ها این گونه تصور می‌شد که عامل اصلی ایجاد بیماری انتریت نکروتیک در طیور توکسین آلفا می باشد؛ اما پس ازشناسایی ژن *netB* مشخص گردیدکه این ژن در ایجاد بیماری‌زایی *کلستریدیوم پرفرینجنس* نقش اساسی دارد و به عنوان عامل اصلی در روند بیماری زایی آنتریت نکروتیک معرفی گردید (**۱۹**). نقش احتمالی ژن های *netB* و *tpeL* در ایجاد مسمومیت غذایی مرتبط با *کلستریدیوم پرفرینجنس* بایستی مورد تحقیق قرار گیرد. Keyburn و همکاران (۲۰۰۸)، در مطالعه‌ای سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از مرغان مبتلا به انتریت نکروتیک را از بابت حضور ژن *netB* مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژن *netB* در ۷۷٪ این جدایه ها وجود دارد (**۸**). نتایج این مطالعه با مطالعه Keyburn و همکاران (۲۰۱۰) که نشان دادند ۷۰٪ جدایه های مربوط به گله های بیمار و ۳/۶٪ از جدایه های مربوط به گله های سالم واجد ژن *netB* بودند، مطابقت داشت.

مطالعات مختلفی (**۲۳-۲۱، ۱۰**) که بر روی سویه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از مرغان سالم و مرغان مبتلا به انتریت نکروتیک انجام شده، نشان داده که ژن *netB* تنها درجدایه‌های مبتلابه انتریت نکروتیک وجود دارد و در جدایه های بدست آمده از مرغان سالم این ژن ردیابی نشده است. این موضوع نشان می دهد که حضور این ژن در بروز بیماری انتریت نکروتیک در طیور نقش مهم و اساسی دارد. با این وجود Abildgaard و همکاران(۲۰۱۰) در مطالعه ای متفاوت، نشان دادند که تنها۵۰٪ جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از طیور مبتلا به انتریت نکروتیک و ۶۰٪ جدایه‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از مرغان سالم واجد ژن *netB* می باشند. این مطالعه تنها گزارشی است که در آن درصد حضور ژن *netB* در جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* جداشده از مرغان سالم بالاتر از درصد حضور این ژن در جدایه‌های اخذ شده از مرغان مبتلا به انتریت نکروتیک می‌باشد (**۲۰**).

Coursodon و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای گروه‌های مختلف از مرغان مبتلا به انتریت نکروتیک را مورد بررسی قرار دادند. جدایه های *کلستریدیوم پرفرینجنس* بدست آمده از نمونه‌های روده، نشان داد که ژن *tpeL* باعث گسترش شدید بیماری انتریت نکروتیک و افزایش میزان ضایعات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و علائم درمانگاهی این بیماری می‌شود (**۱۵**). اگرچه در این مطالعه نشان داده شد که ژن *tpeL* باعث افزایش ضایعات ایجاد شده در بیماری انتریت نکروتیک در طیور می‌شود؛ ولی هنوز نقش ژن *tpeL* در روند ایجاد بیماری به خوبی مشخص نشده است. البته گزارش دیگری نقش توکسین cpb را و به ویژه

در تیپ C در ایجاد بیماری بسیار موثرتر نسبت به سایر توکسین ها معرفی کرده است. با توجه به اینکه کلیه ی جدایه های بدست آمده در مطالعه ی ما از نوع تیپ C *کلستریدیوم پرفرینجنس* می باشد، انتقال این ژن به انسان از طریق فرآورده های طیور محتمل به نظر می رسد.

با توجه به نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که آلودگی مرغ و فرآورده های آن با *کلستریدیوم پرفرینجنس* طی کشتار و یا فرآوری و عدم نگهداری مناسب می تواند به انسان منتقل شده و باعث ایجاد مسمومیت غذایی در انسان شود. مسمومیت های غذایی ناشی از تیپ C *کلستریدیوم پرفرینجنس* در انسان بسیار کشنده تر از تیپ A آن می باشد. همچنین امکان انتقال ژن *netB* از طیور به انسان وجود دارد. بنابراین رعایت موارد بهداشتی در حین کشتار و بسته بندی مناسب مرغ و فراورده های آن بسیار حائز اهمیت می باشد. از طرفی با توجه به اینکه روش های روتین آزمایشگاهی بسیار پرهزینه و وقت گیر بوده و از حساسیت کمتری برخوردار می باشد، روش Multiplex PCR می تواند به عنوان یک روش مناسب و قابل اطمینان برای تعیین تیپ *کلستریدیوم پرفرینجنس* باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می دانند از آقایان دکتر بهرام شجاع دوست و دکتر علی طلوع زرین بدلیل در اختیار قراردادن سویه های استاندارد و آقای علی کارگر و سرکار خانم خواجه نصیری، کارشناسان آزمایشگاه بدلیل کمک های بی دریغ در اجرای این تحقیق و معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بدلیل تامین هزینه های اجرای این تحقیق به شماره ۲۲۱۲۵ قدردانی و تشکر نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 216-234.
2. Brynestad S, Granum PE., Clostridium perfringens and foodborne infections. Int J Food Microbiol. 2002; 74: 195-202.
3. Poursoltani M, Razmyar J, Mohsenzadeh M, Peighambari M. Isolation and antibiotic susceptibility testing of *Clostridium perfringens* isolated from packaged wing, neck, liver and gizzard of broilers in retail stores of Northeastern of Iran. Iranian J Med. Microbiol. 2013; 7(1): 35-39.
4. Slavic D, Boerlin P, Fabri M, Klotins KC, Zoethout JK, Weir PE, Bateman D. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. Can J Vet Res. 2011;75:89–97.
5. Engstrom BE, Former C, Lindberg A, Saarinen E, Baverud V, Gunnarsson A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. Vet Microbiol 2003; 94(3): 225-235.
6. Van Immerseel F, De Buck J, Dammans F, Huyghebaert G, Hesebrouck F, Ducatelle R, *Clostridium perfringens* in poultry; an emerging threat for animal and public health. Avian Pathol. 2004; 33: 537-549.
7. Waters M, Sovoie A, Garmory HS, Buesched D, Popoff MR, Songer G, Titball RH, MacClane BA, Sarker MR. Genotyping and phenotyping of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gasterointestinal diseases in piglets. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3584-3591.
8. Keyburn A L, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Di Rubbo A, Rood JI, Moore RJ. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. PLoS Pathog. 2008; 4(2): e26.
9. Keyburn AL, Yan XX, Bannam TL, Van Immerseel F, Rood JI, Moore RJ. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. Vet Res 2010; 41(2): 21
10. Martin TG, Smyth JA. Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. Vet Microbiol 2009. 136(1-2): 202-205.
11. Amimoto K, Noro T, Oishi E Shimizu M. A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. Microbiology. 2007; 153(4): 1198-1206.
12. Nagahama M, Ohkubo A, Oda M, Kobayashi K, Amimoto K, Miyamoto K, Sakurai J. *Clostridium perfringens* TpeL Glycosylates the Rac and Ras Subfamily Proteins. Infect Immun 2011, 79(2):905-910.
13. Food and Drug Administration. Bacteriologic analytical manual, Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, Md. 2001.
14. Uzal FA, Songer JG. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. J Vet Diagn Invest. 2008; 20: 253-265.
15. Coursodon CF, Glock RD, Moore KL, Cooper KK, Songer JG., TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. Anaerobe. 2012; 18: 117-121.

16. Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. Am J Vet Res 1997; 58: 702-705.
17. Al-Khaldi SF, Myers KM, Rasooly A, Chizhikov V. Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. Mol Cell Probes 2004; 18: 359-367.
18. Nowell VJ, Poppe C, Parreira VR, Jiang YF, Reid-Smit Rh, & Prescott JF., *Clostridium perfringens* in retail chicken. Anaerobe 2010; 16: 314-315.
19. Chalmers G, Bruce HL, Hunter DB, Parreira VR, Kulkarni RR, Jiang YF, Prescott JF, Boerlin P. Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. J Clin Microbiol 2008; 46: 3957-3964.
20. Abildgaard L, Sondergaard TE, Engberg RM, Schramm A Hojberg O., In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. Vet Microbiol 2010; 144: 231-235.
21. Johansson A, Aspan A, Kaldhusdal M, Engstrom BE. Genetic diversity and prevalence of netB in Clostridium perfringens isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. Vet Microbiol 2010; 144(1-2): 87-92.
22. Keyburn AL, Portela RW, Sproat K, Ford ME, Bannam TL, Yan X, Rood JI, Moore RJ. Vaccination with recombinant netB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. Vet Res 2013; 44(1): 54.
23. Leppe D, Gong J, Songer JG, Boerlin P, Parreira VR, Prescott JF. Identification of accessory genome regions in poultry Clostridium perfringens isolates carrying the netB plasmid. J Bacteriol 2013; 195(6): 1152-1166.