المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ١، ٢٠٠٩ (٢٢٩-٢٣٢)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

تشخيص عترات جرثومة المطثية الحاطمة المعزولة من حالات تذيفن الدم المعوي في الأغنام باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز

محمد علي حمد[١]، ناجح هبره[٢] وعبد الكريم قلب اللوز[٣]

[١]قسم الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق،
[٢]قسم الأحياء الدقيقة، [٣]قسم أمراض الحيوان، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، سوريا
E-mail: mohamad_alihamad@yahoo.com

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة تشخيص وتنميط ١٠٠ عزلة جرثومية من جراثيم المطثية الحاطمة المعزولة من حالات تذيفن الدم المعوي في أغنام محافظة حماه باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز المتعددة العناصر. التنميط الجيني لهذه العزلات اشار إلى أن جميع العزلات هي لجراثيم المطثية الحاطمة وان ٤٧ عزلة منها هي من النمط A (٤٧ %) و ٣٨ عزلة من النمط D (38 %) و ١٥ عزلة من النمط C (١٥٪) مع سيادة واضحة لعترات النمط A مما يستوجب الانتباه إلى هذا النمط كأحد المسببات الرئيسية لمرض تذيفن الدم المعوي في الأغنام.إن تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز يمكن استخدامها في تشخيص وتنميط عترات جرثومة المطثية الحاطمة بدلا من الطرق التقليدية.

Diagnosis of *Clostridium perfringens* strains isolated from enterotoxemia cases in sheep using polymerase chain reaction (PCR) technique

M. A. Hamad[1], N. Habra[2], A. Kalb-Allouz[3]

[1]Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq,
[2]Department of Microbiology, [3]Department of Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, AL-Baath University, Syria

Abstract

This study included diagnosis and typing of 100 bacterial isolates of *Clostridium perfringens* that isolated from enterotoxaemia cases in sheep in Hama province by using Multiplex PCR. The genotyping of these isolates indicated that all isolates were *Clostridium perfringens* and 47 of them were type A (47 %), 38 were type D (38%), and 15 were type C (15%), with obvious predominating for type A strains which deserve the attention to this type as a one of major causes of enterotoxaemia in sheep. Multiplex PCR technique can be used in diagnosis and typing of *C. perfringens* strains instead of conventional procedures.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

المطثية الحاطمة *Clostridium perfringens* جراثيم موجبة لصبغة غرام متبوغة و لاهوائية مسؤولة عن مجموعة متنوعة من الأمراض في الإنسان والحيوانات (١). تسبب هذه الجراثيم أمراض معوية وأمراض تذيفن الدم المعوي enterotoxemic في الحيوانات والتسمم الغذائي، الموات، والتهاب الأمعاء النخري في البشر (٤). الجرثومة تصنف إلى خمسة أنماط (A- E) اعتمادا على أنتاجها من الذيفانات الرئيسية الأربعة وهي ذيفان الفا، بيتا، ابسيلون، وايوتا (٣)، وهذه الذيفانات تنتج من قبل الجرثومة ولها علاقة وثيقة بأمراضية الجرثومة على الرغم من أن الجرثومة تفرز عدة ذيفانات خارجية بسيطة minor extracellular toxins (٢). إن تنميط جراثيم المطثية الحاطمة كان يجرى بشكل تقليدي عن طريق اختبارات معادلة الذيفان toxin neutralization test في الفئران أو خنازير غينيا. هذا الاختبار يستهلك وقت، كميات من المصل الضد،وأعداد من الحيوانات المختبرية (٥). استعملت في السنوات الأخيرة عدد من الاختبارات المصلية و التقنيات الجزيئية لتنميط الذيفانات منها رحلان كهربائي مناعي معاكس

counter immuno-electrophoresis (CIE) (٦) كذلك مقايسة Enzyme-linked immuno sorbent assay (إليزا ELISA) (٧-٩) واختبار تراص اللاتكس latex agglutination test (LAT) (١٠،١١) وتفاعل سلسلة البوليمراز PCR (٢،٣،١٢-١٦). هذه الاختبارات بسيطة الاجراء ومحدودة الكلفة وتعطي نتائج كمية ويمكن استعمالها للتنميط الذيفاني وللتشخيص التفريقي لتذيفن الدم المعوي المسبب بالمطثية الحاطمة أنماط A، B، C و D (٣،٧،١٥). إن هدف الدراسة الحالية هو التنميط الجيني لعزلات جرثومة المطثية الحاطمة المعزولة من حالات تذيفن الدم المعوي في أغنام محافظة حماه في سورية باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز المتعددة العناصر.

المواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية

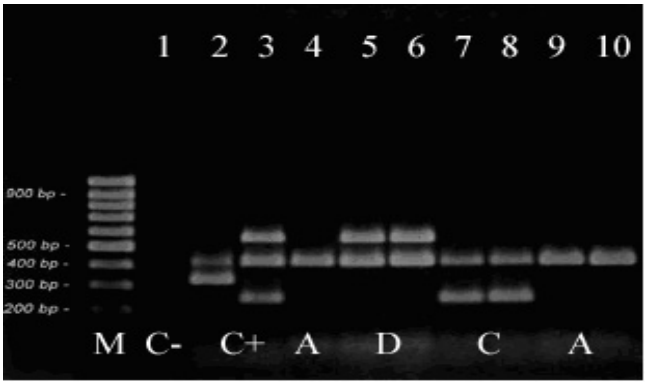
أجريت الدراسة على ١٠٠ عزلة جرثومية من جراثيم المطثية الحاطمة المعزولة من المحتويات المعوية و الأحشاء لأغنام نافقة بمرض تذيفن الدم المعوي وشخصت هذه العزلات بعد زرع العينات في وسط زرعي سائل هو وسط الثيوكليكولات Thioglycolate medium وحضن لاهوائيا بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة، ثم زرع على الأوساط الصلبة الانتقائية للمطثيات وخصوصا المطثية الحاطمة وهي وسط CW agar medium (وسط المطثية الولشية *Clostridium welchii* agar medium) ووسط SPS (sulfite-polymyxin B -sulfadiazine) وحضنت أيضا لاهوائيا بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة (١٧). بعد نمو المستعمرات على الأوساط الانتقائية شخصت بالاعتماد على الشكل المستعمري و التصبيغ بصبغة كرام ونمط التحلل الدموي على أكار الدم والاختبارات الكيميوحيوية.

استخلاص الدنا و تفاعل سلسلة البوليمريز متعدد العناصر DNA extraction and multiplex PCR

استخدمت طريقة مرجعية في استخلاص الدنا وإجراء اختبار multiplex PCR (١٥) حيث نميت عزلات جرثومة المطثية الحاطمة على أكار الدم، وبعدها تم اخذ ثلاثة مستعمرات جرثومية ومزجت في ٣٠٠ مكروليتر ماء مقطر، وحضن المزيج بعد ذلك بدرجة ٥٦ْم لمدة ٣٠ دقيقة. العينات عوملت مع ٣٠٠ مكرولتر من دارئ TNES (20 mM Tris pH8.0, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 0.2% SDS) و بروتينيز K (٢٠ ملغم/مل). بعد حضن المزيج بدرجة ٣٧ْم لفترة ساعتين تم غليه لمدة ١٠ دقائق ثم أضيف إلى المعلق السابق حجم مساوي من الفينول (مشبع بالتريس- حمض كلور الماء saturated with Tris-HCL). تم رج المعلق بقوة باليد ونبذ بسرعة ١١٦٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ١٠ دقائق. نقلت الطبقة العلوية إلى أنبوبة أخرى وأضيف لها اسيتات الصوديوم (٠,١ حجم) وايثانول (٢,٥ حجم). حفظ المعلق بدرجة – ٢٠ْم لمدة ساعة ونصف ثم نبذ بسرعة ١١٦٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ١٠ دقائق. تم غسل الراسب بالايثانول بتركيز ٩٥ % ثم بتركيز ٧٠ % و في كل خطوة من الغسل تتبع بطرد مركزي لمدة ٥ دقائق. تم تجفيف الأنبوبة ثم أعيد تعليق الراسب في ٥٠ مكرولتر ماء مقطر. تفاعل سلسلة البوليمراز عمل في المبلمر الحراري الهابط (touchdown thermocycler) في حجم تفاعل كلي من ٥٠ مكرولتر محتوية ٥ مكرولتر من 10 × PCR buffer (10mM Tris-HCL, pH 9.0, 50mM KCL, 0.1 % Trition X-100)، ٥ مكرولتر من 25mM MgCl2، ٢٠٠ مكرومول من كل deoxynucleotide triphosphate، ٥ وحدات من*Taq* DNA polymerase ، ١ مكرومول من كل بادئ من البادئات primers و ٥ مكرولتر من مرصاف أو طبعة الدناtemplate DNA. بادئات ذيفانات الفا و بيتا و ابسلون و ايوتا مصنعة من قبل شركة كيجين Kiagen استعملت في Multiplex PCR. أجريت عملية التضاعف Amplification بواسطة جهاز المبلمر الحراري المبرمج على ثلاثين دورة بعد خطوة المسخ denaturating الأولي عند درجة حرارة ٩٤ْم لمدة ٥ دقائق. كل دورة شملت مسخ عند درجة حرارة ٩٤ْم لمدة دقيقة واحدة، ارتباط annealing البادئ بدرجة ٥٥ْم لمدة دقيقة، و استطالة synthesis عند درجة حرارة ٧٢ْم لمدة دقيقة واحدة ثم دورة نهائية بدرجة حرارة ٧٢ْم لمدة ١٠ دقائق وذلك للتأكد من أن الدنا المتشكل مزدوج السلسلة. ١٠ مكرولتر من النواتج المتضخمة رحلت كهربائيا electrophoresed في هلامة الاكروز agarose gel بتركيز ١,٥ % مع الدليل الحجمي القياسي DNA Leader 100bp وصبغت ببروميد الإيثيديوم ethidium bromide. الحزم المتضخمة أظهرت وصورت تحت الإضاءة فوق البنفسجية باستخدام جهاز UV transillumination.

النتائج

العزلات الجرثومية المستخدمة في الدراسة (١٠٠ عزلة) كانت جميعها تابعة لجرثومة المطثية الحاطمة حسب نتائج تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز (PCR). تم تصنيف العزلات بالاعتماد على نتائج هذا الاختبار إلى أنماط حسب حزم بروتينات الذيفانات المرحلة كهربائيا فالنمط A يظهر حزم بروتين ذيفان الفا، النمط B تظهر حزم بروتينات الفا وبيتا و ابسيلون، النمط C حزم الفا وبيتا، نمط D حزم الفا و ابسيلون، و نمط E حزم الفا و ايوتا (الشكل١). العزولات الجرثومية صنفت إلى ثلاثة أنماط جينية هي نمط A وكانت بأعلى نسبة بين العزولات ٤٧ % (٤٧ عزولة)، ثم نمط D ٣٨ %، ونمط C ١٥٪ (الجدول رقم ١).



الشكل رقم (١): يمثل حزم الذيفانات المرحلة على هلام الاكروز ١,٥ % مع الدليل الحجمي القياسي DNA ladder 100bp (M). ١: (C-) شاهد سلبي، ٢: (C+) شاهد ايجابي لجينات ذيفانات الفا(*cpa*) و ايوتا(*iap*)، ٣: (C+) شاهد ايجابي لجينات ذيفانات الفا(*cpa*) و بيتا (*cpb*) و ابسلون (*etx*)، ٥ -٦: المطثية الحاطمة نمط D، ٧-٨: المطثية الحاطمة نمط C، ٤، ٩-١٠: المطثية الحاطمة نمط A.

الجدول رقم (١): يبين الانماط الجينية لجراثيم المطثية الحاطمة المعزولة من حالات تذيفن الدم المعوي في الأغنام.

عدد العزولات الجرثومية	جين ذيفان الفا α	جين ذيفان بيتا β	جين ذيفان ابسيلون ε	جين ذيفان ايوتا ι	النمط الجيني
٤٧	+ + +	- - -	- - -	- - -	A
٣٨	+ + +	- - -	+ + +	- - -	D
١٥	+ + +	+ + +	- - -	- - -	C

المناقشة

جراثيم المطثية الحاطمة تسبب مجموعة كبيرة من الأمراض في الإنسان والحيوانات، ويعتبر مرض تذيفن الدم المعوي بأشكاله المتعددة من أهم هذه الأمراض في الحيوانات وخصوصا الأغنام لما يسببه المرض من خسائر كبيرة متمثلة بنفوق غالبية الحيوانات المصابة، إضافة إلى تكاليف المعالجة والسيطرة والوقاية من المرض، انخفاض الأداء الإنتاجي للقطيع المصاب وارتفاع معدلات الحيوانات المستبعدة والمستبدلة هذه الأمور كلها تساهم في ارتفاع الخسائر (١٨،١٩). نتائج هذه الدراسة أظهرت أن جميع العزولات كانت تابعة لجراثيم المطثية الحاطمة وان التنميط الجيني صنف العزولات إلى ثلاثة أنماط هي نمط A (٤٧ %)، نمط D (٣٨ %)، ونمط C (١٥ %)، وقد كان النمط A هو السائد. نتائج هذه الدراسة مشابهة لما ذكرته دراسات أخرى في العالم حيث ذكرت دراسات في تركيا (٨،١٥) ومصر (٢١،20)، ونيجيريا (٢٢،٢٣) و ايطاليا (14)، واليونان(٢٤) وغيرها (٢٥،٢٦) إلى عزل نفس الأنماط و أيضا سيادة النمط A، بينما أشارت دراسات أخرى إلى عزل هذه الأنماط من حالات تذيفن الدم المعوي في الأغنام ولكن كان النمط D هو السائد فيها (٧،٢٧،٢٨،٢٩).إن سيادة النمط A دون بقية الأنماط في حالات تذيفن الدم المعوي قد يفسر بأن الجرثومة موجودة طبيعيا في أمعاء الأغنام كجزء من النبيت المجهري الطبيعي Microflora والتي تتضاعف بمعدلات كبيرة وتنتج الذيفانات في بعض الحالات مثل فرط الأكل أو التغيرات الغذائية أو غيرها من العوامل المؤهبة لحدوث المرض (٢٦)، ومما يدعم النتيجة السابقة بسيادة النمط A هو أن معظم المربين يعتمدون برامج التلقيح ضد المرض بلقاحات غالبيتها العظمى إن لم تكن جميعها تحتوي الأنماط D و C إلا أن المرض دائم الحدوث. مرض تذيفن الدم المعوي في الأغنام تسببه المطثية الحاطمة بجميع أنماطها (٤)، على الرغم من أن دور النمط A في إحداث المرض مبهم أو مشكوك به من قبل بعض الباحثين (٣٠). بعض عترات المطثية الحاطمة قد تكون غير قادرة على إنتاج الذيفانات بكميات ممكنة القياس تحت الظروف المختبرية وهذا يشكل عائق في محاولة تنميطها بالطرق التقليدية.تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز وخصوصا المتعددة العناصر استعملت في تحديد الأنماط الذيفانية للمطثية الحاطمة (٢،٣،١٢،١٥).

نستنتج من هذه الدراسة أن أنماط المطثية الحاطمة A وD وC تسبب مرض تذيفن الدم المعوي في الأغنام في محافظة حماه وخصوصا النمط A، كما أن تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز المتعددة العناصر يمكن استعمالها في تشخيص وتنميط عزولات المطثية الحاطمة بدلا من الطرق التقليدية.

المصادر

1. Niilo L. Enterotoxemic *Clostridium perfringens*, p. 114–123. *In* C L Gyles and CO Thoen (ed.), Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa State University, Ames. 1993.
2. Meer RR, Songer JG. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. American Journal of Veterinary Research. 1997;58:702–705.
3. Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and Epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1997;35:228-232.
4. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin Microbiol Rev. 1996;9:216-234.
5. Duchesnes C, Granum PE, Menozzi MG , Peck M, Pelkonen S, Popoff M, Stackebrandt E , Titball R.European Commission-European Concerted Action QLK2-CT2001-01267 :Clostridia in medical, Veterinary and food microbiology Diagnosis and typing. Key Action 2 – Control of infectious diseases EUR 21463 EN 2006.
6. Henderson TG. The detection of *Clostridium perfringens* type D enterotoxin in the intestinal contents of animals by counter immunoelectrophoresis. N Z J Sci. 1984;27:423-426.

7. El Idrissi AH, Ward GE. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias.Vet Microbiol. 1992;31:389-396.
8. Gokce HI, , Genc O, Sozmen M, Gokce G.Determination of *Clostridium perfringens* Toxin-Types in Sheep with Suspected Enterotoxemia in Kars Province,Turkey. Turk J Vet Anim Sci.2007;31(5):355-360.
9. Naylor RD, Martin PK, Sharpe RT. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. Res Vet Sci. 1987;42:255-256.
10. McClane BA, Snyder JT. Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J Immunol Methods. 1987;100:131-136.
11. Martin PK, Naylor RD. A Latex agglutination test for the qualitative detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. Res Vet Sci. 1994;56:259-261.
12. Baums C.G., Schotte U., Amtsberg G., Goethe R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Veterinary Microbiology. 2004;20:11–16.
13. Gkiourtzidis K., Frey J., Bourtzi-Hatzopoulou E., Iliadis N., Sarris K. PCR detection and prevalence of α-, β-, β2, ε-, ι- and enterotoxin genes in *Clostridium pefringens* isolated from lambs with clostridial dysentery.Veterinary Microbiology.2001;82:39–43.
14. Greco G, Madio A, Buonavoglia D, Totaro M, Corrente M, Martella V, Buonavoglia C. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and Kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. Vet J 2005;170:346-350.
15. Kalender H, Ertas HB, Cetinkaya B, Muz A, Arslan N, Kılıc A. Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multi- plex PCR. Vet Med-Czech. 2005;50:439-442.
16. Uzal F.A., Plumb J.J., Blackall L.L., Kelly W.R.PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in fasces of goats. Letters in Applied Microbiol.1997;25:339–344.
17. Quinn P.J., Carter M.E. , Markey B., Carter G.R. Clinical Veterinary Microbiology 6th ed. Mosby. Edinburgh, New York. 2004;Pp. 191-208.
18. Mathur PB and Dubey SC. Infectious diseases. Sheep and goat diseases. ICAR, New Delhi. pp. 25.
19. Senthilkumar V.Thirunavukkarasu M. and Kathiravan G.. Economic losses due to enterotoxaemia in sheep. Indian J Sci Technol. 2008; 1(6):1-3.
20. Doghaim R, EL-Miniawy, Hasan NA. Aetiopathology of Enteritis in sheep caused by anaerobic and parasitic agents:Alight and Scanning Microscopic Study. Assiut Vet Med J.2000;44(87):149-155.
21. Mahmoud FA. Microbiological studies on obligatory anaerobic microorganism causing diseases in Egyptian Sheep and Goat. PhD Thesis ;Fac. Vet Med Cairo Univ. 1996.
22. Efuntoye MO, Adetosoye AI. Clostridial diarhoea in food animals in Ibadan, Nigeria. Israel J Vet Med. 2003;58:16-19.
23. Itodo AE, Adesiyun AA, Odekeye OJ, Umoh JU. Toxin types of *Clostridium perfringens* strains isolated from sheep, cattle and paddock soils in Nigeria. Vet Microbiol.1986;12:93–96.
24. Deligaris N M. Study of enterotoxaemia of small ruminants (sheep and goat). Types of *Clostridium perfringens* responsible for the disease in Greece. Hellenic Vet Med. 1978;21:74–76.
25. Miserez R, Frey J, Buogo C, Capaul S, Tontis A, Burnens A, Nicolet J. Detection of alpha- and-epsilon-toxigenic *Clostridium perfringens* type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). Lett Appl Microbiol. 1998;26:382-386.
26. Popoff MR. Bacteriological examination in enterotoxaemia of sheep and lamb. Vet Record. 1984;114:324.
27. Osturk G. Etiopathology of enterotoxaemia in small ruminants in Elazıg and surrounding cities. Turk J Vet Anim Sci. 1996;20:63-68.
28. Ozcan C, Gurcay M. Enterotoxaemia incidence in small ruminants in Elazıg and surrounding provinces in 1994-1998.Turk J Vet Anim Sci. 2000;24:283-286.
29. Tooloei M and Masodei MH. The distribution and prevalence rate of enterotoxaemia in sheep in east Azerbaijan province, Northwestern Iran in spring 2008.J of Animal and Veterinary Advances. 2008;7(11):1434- 1439.
30. Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease:a review of current knowledge. Can. Vet. J. 1980;21:141–148.