شناسایی کلستریدیوم سپتیکوم به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

دکتر محمد همتی[1]* دکتر احمد مرشدی[2] دکتر قاسم یوسف بیگی[2] دکترمحسن فتحی نجفی[1]

دریافت مقاله: ۱۰ آبانماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۱۰ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

هدف: تایید تشخیص کلستریدیوم‌سپتیکوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش (PCR) دربین کلستریدیوم‌های جداشده ازمدفوع گوسفندان منطقه ارومیه.

طرح: مطالعه‌آزمایشگاهی.

نمونه‌ها: ۲۸سویه کلستریدیوم جداشده ازصد نمونه مدفوع گوسفندی منطقه ارومیه.

روش: نمونه برداری از مدفوع تازه‌گوسفندی، انجام‌آزمایشات استاندارد میکروب شناسی برای جداسازی کلستریدیا، استخراج DNA ازسویه‌ها، انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده ازقطعه ژنی آلفا-توکسین.

نتایج: آزمون بر روی تمامی ۲۸سویه به اضافه‌سویه واکسنی کلستریدیوم‌سپتیکوم به عنوان‌شاهد مثبت وسه تیپ B,C,D ازکلستریدیوم پرفرنژنس به عنوان‌شاهد منفی انجام‌گردید. پس ازانجام عملیات استخراج DNA، با پرایمر اختصاصی قطعه‌ای از ژن همولیزین کلستریدیوم‌سپتیکوم (توکسین آلفای باکتری) عملیات PCR صورت پذیرفت. هرشش‌سویه کلستریدیوم‌سپتیکوم به اضافه‌سویه واکسن در ژل آگارز باند ۲۷۰ جفت بازی را از خود نشان دادند که به عنوان قطعه مورد نظر در ژن همولیزین کلستریدیوم‌سپتیکوم تلقی گردید. تمامی‌گونه‌های دیگر کلستریدیای استفاده‌شده، با این پرایمر منفی بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست‌آمده، می‌توان پیشنهاد استفاده ازروش PCR با پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص‌سریع واختصاصی کلستریدیوم‌سپتیکوم را توصیه نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۱، ۵۰-۴۷.

واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، همولیزین، آلفا-توکسین، کلستریدیوم سپتیکوم.

بعضی معتقدند که زیستگاه اصلی کلستریدیا دستگاه گوارش است و وجود باکتری در خاک نشانگر آلودگی خاک به مدفوع می باشد ولی منطقی تر بنظر می‌رسد که خا ستگاه اصلی اغلب بی هوازیها را خاک بدانیم. باکتری با بلع مواد گیاهی وارد دستگاه گوارش می شود و بعضی بصورت موقت و یا دایمی با شرایط زندگی دردستگاه گوارش خو می‌گیرند. کلستریدیا اگر چه معمولاً زندگی ساپروفیتی دارند ولی بعضی از گونه‌ها بعنوان عوامل بیماریزا در انسان و دام شناخته شده‌اند(۱). کلستریدیوم سپتیکوم نیز مانند سایر کلستریدیا عمدتاً در خاک و دستگاه گوارش زیست می‌کند. باکتری از خاک مناطق مختلف جدا شده است. آلوده بودن لباس به این باکتری می تواند ناشی از آلودگی مستقیم یا غیر مستقیم به مدفوع باشد. در گزارشات متعدد از بیماریهای مختلفی از انسان و دام و حتی از حفرات سلی و از ادرار انسان نیز

۱) موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه مشهد، مشهد - ایران.
۲) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.
*) نویسنده مسؤول: m_hemmaty@yahoo.com

Diagnosis of *Clostridium Septicum* Using Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hemmaty, M.[1], Morshedy, A.[2], Yosofbeigy, Gh.[2], Fathi Najafi, M.[1]

[1]Razi vaccine and serum research institute of Mashhad, Mashhad-Iran.
[2]Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.

Objective: Identification and confirmation of *Clostridium septicum* in isolated Clostridia from sheep-dung samples by PCR.

Design: Laboratory study.

Samples: Twenty eight Clostridia were isolated from 100 sheep-dung of Urmia.

Procedure: Sheep-dung samples were collected and Clostridia isolated according to microbial tests. the DNA of isolates were extracted and used for PCR. PCR was performed by using designed primer for hemolysin gene (alpha toxin) of *Cl.Septicum*. A vaccine strain of *Cl. Septicum* and *Cl.pefringenes* types B, C and D were used as positive and negative control, respectively.

Results: Six out of 28 isolates and also vaccine strain showed 270 bp band on agarose gel electrophoresis, suggesting conserved segment for hemolysin in *Cl.septicum*. On the other hand, other isolates such as *Clostridium fallax*, *Cl.perfringenes*, *Cl.novey B*, *Cl. bifermentnas*, *Cl.carnis*, *Cl.Subterminale*, *Cl.rummosum*, *Cl.innoccum* were negative.

Conclusion: Since the DNA fragment of 270-bp was not amplified for *Cl.perfringens*, *Cl.novyi*, *Cl.fallax*, *Cl.innoccum*, *Cl.carnis*, *Cl.subterminale*, *Cl.bifermentance* and *Cl.ramusum*, this condition confirmed specificity of this primer. Hence, PCR can be useful for rapid detection or identification of *Cl.septicum* in clinical or environmental samples. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,1:47-50,2006.***

Keywords: *Clostridium septicum*, PCR, hemolysin(alpha toxin)

Corresponding author's email: m_hemmaty@yahoo.com

جدا شده است(۷).

کلستریدیوم سپتیکوم عامل ادم بدخیم، براکسی و شاربن علامتی کاذب در حیوانات و قانقاریای گازدار در انسان است. این باکتری از جهات مختلف به کلستریدیوم شوویی عامل شاربن علامتی گاو و گوسفند شباهت دارد. این دو باکتری هریک چهار توکسین اصلی به نامهای آلفا، بتا، گاما و دلتا

تولید میکنند که از نظر فعالیتهای بیولوژی به یکدیگر شباهت دارند. بعلاوه این دو باکتری واجد آنتی ژنهای مشترکی هستند که بروش آزمایشات تثبیت عوامل کمپلمان، ایمونوفلوروسنت آنتی بادی و ELISA قابل ردیابی است(۱،۹).

در حال حاضر تفریق بیماری ناشی از این دو عامل با مجموعه علایم کلینیکی، تعیین نوع توکسین، جداسازی و شناسایی باکتری انجام می‌شود(۸،۹). انجام این آزمایشات پیچیده، چندین روز کار آزمایشگاهی نیاز دارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک تکنیک ژنتیک ملکولی است که در شرایط آزمایشگاهی قادر به تکثیر اسید نوکلئیک است. با این تکنیک می‌توان باکتری را سریعتر و مستقیما از نمونه‌های کلینیکی و یا حتی در نمونه محیط طبیعی مورد شناسایی قرار داد (۴،۹). این تحقیق برآن است که با شناسایی قسمتی از ژن همولیزین (توکسین آلفا) کلستریدیوم سپتیکوم بروش PCR بسیار سریعتر و اختصاصی تر از روشهای رایج این باکتری را مورد شناسایی قرار دهد.

مواد و روش کار

۱- **نمونه برداری**: در مطالعه قبلی تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع گوسفندی در منطقه ارومیه با کشت و آزمایشات بیوشیمیایی مورد بررسی باکتری شناسی قرار گرفت و کلستریدیوم فالاکس، ک. پرفرنژنس، ک. کارنیس، ک. نوویی تیپ B، ک. رموزوم، ک. ساب ترمیناله، ک. بایفرمنتانس و ک. اینوکوم و شش سویه از ک. سپتیکوم جداسازی و با آزمون‌های میکروب شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند.

۲- **استخراج DNA**: عملیات استخراج DNA برروی تمامی انواع گونه‌های جداسازی شده باضافه سویه واکسنی ک. سپتیکوم بعنوان شاهد مثبت و سه تیپ B,C,D از سویه واکسنی ک. پرفرنژنس بعنوان شاهد منفی انجام شد. باکتریها در شرایط بی هوازی (جار واجد گاز پک A ساخت Merck) بمدت ۲۴ ساعت در تیوگلیکولات کشت داده شدند. پس از سانتریفوژ، از رسوب پیکره باکتریها با ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE(Tris 10mM,EDTA 1mM pH 8.0) سوسپانسیون تهیه گردید. در ابتدا باکتریها با ۱۰۰µg/ml لیزوزیم (Roche) برای مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد تیمار گردید. سپس ۱ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ۱۰۰µg/ml پروتئیناز K (Fermentas) به نمونه اضافه شد و در ۳۷ درجه برای مدت ۳۰-۲۰ دقیقه جهت لیز سلولی قرار گرفت.

در ادامه، ترسیب پروتئین با فنل (equilibrated phenol) انجام گردید و پس از سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور بمدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد، فاز مایع رویی جدا و هم حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد. مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق آهسته مخلوط و سپس برای مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. ۴ میکرولیتر از فاز مایع رویی بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید تا از صحت مراحل استخراج و وجود DNA تا این مرحله اطمینان حاصل گردد. برای حذف RNA اسید نوکلئیک استخراج شده با ۱۰۰µg/ml آنزیم RNase A(Roche) برای مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه تیمار گردید. در انتها برای آبگیری و ایجاد رسوب و تولید کلاف DNA ۱۵۰ میلی مولار کلرور سدیم همراه دو حجم اتانول مطلق استفاده شد و سپس برای رسوب کامل DNA در ۲۰- درجه برای مدت ۲ ساعت و یا یک شب قرار داده شد. رسوب حاصله پس از ۲۰ دقیقه سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه جمع آوری و مجددا با اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید. DNA حاصله در شرایط خلا خشک گردید و در آب دوبار تقطیر استریل حل شد و برای آزمایشات بعدی در ۴ درجه ذخیره شد. کمیت و کیفیت DNA بوسیله الکتروفورز و همچنین با روش اسپکتروفتومتری در نسبت طول موجهای ۲۸۰ :۲۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

۳- **PCR**: ژن همولیزین کلستریدیوم سپتیکوم از ۱۳۲۹ جفت باز تشکیل شده است(۲). پرایمر قسمتی از این ژن مطابق نظر Takeuchi وهمکاران در سال ۱۹۹۷ تهیه گردید(Fermentas). این قسمت شامل ۲۷۰ زوج باز می‌باشد. پرایمرهای جلو (F) Forward و برعکس (R) Reverse واجد ۲۰ جفت باز بترتیب زیر می‌باشند:

F: 5'- AATTCAGTGTGCGGCAGTAG -3'

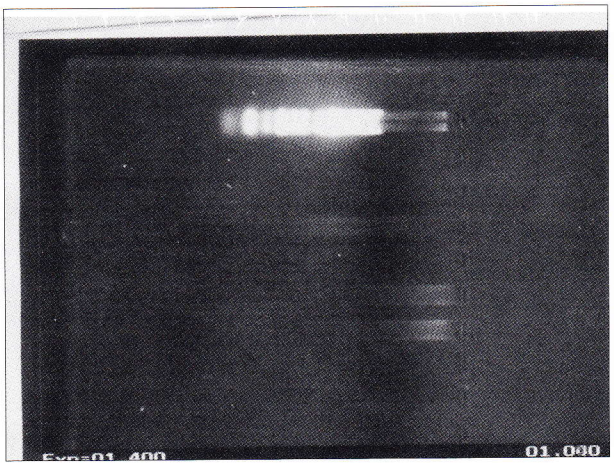
R: 5'-CCTGCCCCAACTTCTCTTTT -3'

ترادف پرایمر F نوکلئوتیدهای شماره ۶۱۱ تا ۶۳۰ از ژن همولیزین را شامل می‌شود و سکانس پرایمر R مکمل نوکلئوتیدهای شماره ۸۶۱ تا ۸۸۰ است(۱۰). سیستم واکنش PCR برای حجم ۱۰۰ میکرولیتر طراحی گردید و غلظت نهایی ۲ میکروگرم از DNA هر نمونه، غلظت ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول از dNTPs، یک واحد بین المللی از (CinnaGen-Recombinant) Taq polymerase و ۱۰ میکرولیتر از بافر (10X) واجد $Mgcl_2$ و بقیه تا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. این مخلوط ابتدا بمدت ۵ دقیقه برای جدا شدن دو رشته DNA از هم در ۹۴ درجه قرار گرفت. هر سیکل PCR شامل Denaturation time در ۹۴ درجه، Annealing time در ۵۵ درجه و Extention time در ۷۲ درجه هر یک بمدت یک دقیقه روی دستگاه ترمال سایکلر (ساخت شرکت Techgene مدل TECHNE) برای انجام ۳۵ سیکل تنظیم گردید. در انتها یک مرحله Final extention بمدت ۵ دقیقه جهت تکمیل رشته‌های DNA انجام شد.

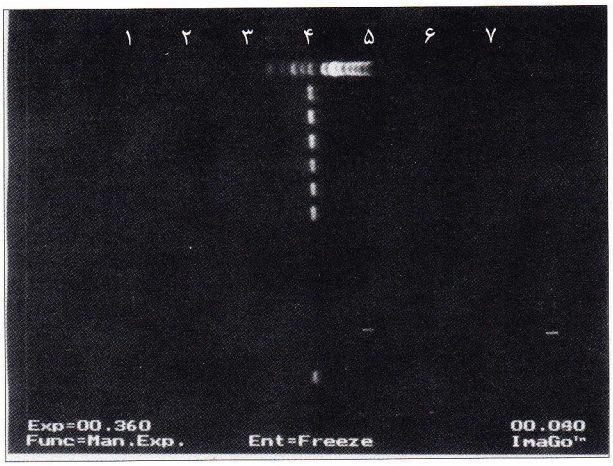
محصول PCR بر روی ۱ درصد ژل آگارز همراه با مارکر (DNA Ladder Gene Ruler®50bp) الکتروفورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با دستگاه UV لومیناتور (Transilluminator, UVP, USA) با اشعه UV بررسی گردید و با دستگاه (B&L systems, Netherlands) ImaGo عکس برداری شد.

نتایج و بحث

طول دوره انکوباسیون بطور معمول برای کلستریدیوم سپتیکوم ۷۲-۴۸ ساعت است(۱) با نزدیک شدن به این زمان باکتری بتدریج وارد مرحله سکون و مرگ می‌گردد و در این مراحل سیستم اتولیز به حداکثر فعالیت خود می‌رسد و بهمراه توکسین بتا (DNase) مترشحه از باکتری، ژنوم را در مراحل



تصویر ۱- چاهک شماره ۱ مارکر ۵۰ جفت بازی، چاهک‌های دو تا هفت محصول PCRنمونه‌های ک.سپتیکوم و چاهک‌های ۸ و ۹ و ۱۰ سویه واکسنی ک.پرفرنژنس تیپ‌های B, C,D و چاهک‌های بعدی بترتیب ک.نوویی تیپ B، ک.فالاکس وک.بایفرمنتانس و چاهک آخر متعلق به شاهد مثبت سویه واکسنی ک.سپتیکوم است.



تصویر۲- چاهک شماره ۱ مارکر ۵۰ جفت بازی، چاهک‌های دو تا هفت محصول PCRنمونه‌های ک.ساب ترمیناله، ک.اینوکوم، ک.راموزوم، ک.کارنیس، دو سویه از ک.پرفرنژنس جداشده می‌باشد.

استخراج مورد تهدید قرار می‌گیرد. لذا از کشت ۲۴ ساعته باکتری یعنی در اوج مرحله لگاریتمی رشد برای استخراج DNAاستفاده گردید.

در مرحله لگاریتمی رشد مقدار RNA بخاطر شرایط تکثیر باکتری و تولید انواع پروتئینها در حداکثر مقدار خود است. RNA بصورت یک اسمیر پهن و بیشتر ژنوم باکتری بر روی ژل آگارز پس از استخراج DNA مشاهده گردید. بنابراین برای حذف آن از آنزیم RNaseA استفاده گردید. روشهای دیگری نیز برای استخراج DNA از بیهوازیها گزارش گردیده است(۹،۱۰).

از آنجا که اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و پروتئینها (براساس وجود سه هسید آمینه آروماتیک) در ۲۸۰ نانومتر جذب نوری بیشتری دارند، با بدست آوردن نسبت این دو می‌توان نسبت خلوص اسید نوکلئیک و مقدار آن را تعیین نمود. وجود پروتئینها از خلوص DNA می‌کاهد بنابراین گاهی پس از برآورد این نسبت تکرار مرحله فنل - کلروفرم ایزوآمیل الکل ضروری است. مقدار DNA استخراج شده را نیز می‌بایست برآورد نمود چرا که در مرحله PCR باید مقدار دقیقی از آن مورد استفاده قرار گیرد. چنانچه در طول موج ۲۶۰ نانومتر جذب نوری مساوی یک گردد مقدار DNAموجود مساوی ۵۰ك $\mu g/ml$ خواهد بود(۳،۴).

حضور تنها یک باند واضح با وزن بالا در ژل الکتروفورز نشانگر خالص بودن DNAژنومیک از سایر اسیدهای نوکلئیک از قبیل DNAسیتوپلاسمی و RNAاست. هر شش نمونه کلستریدیوم سپتیکوم و سویه واکسن پس از PCRوالکتروفورز باند ۲۷۰ جفت بازی را نشان دادند(تصویر۱). این قطعه ۲۷۰ زوج بازی قسمتی از ژن همولیزین یا توکسین آلفای کلستریدیوم سپتیکوم است(۹). توکسین آلفا، توکسین اصلی باکتری است که دارای اثر کشندگی بر روی گلبولهای قرمز انسان و اثر کشندگی بر روی موش است(۱،۲). ژن این پروتئین واجد ۱۳۲۹ زوج باز هسته‌ای است که از نظر وجود بازهای A-T بسیار غنی می‌باشد و قریب به ۸۵-۷۵ درصد آنرا تشکیل می‌دهند(۲). البته کلستریدیوم سپتیکوم کلاو در میان کلستریدیا که میزان درصد G+C آنها بین ۴۵ تا ۲۱ درصد است از کمترین میزان G+C برخوردار است (۱).

توکسین آلفای کلستریدیوم سپتیکوم از نظر فعالیت بیولوژیکی و ایمنی به توکسین آلفای کلستریدیوم شوویی شباهت دارد و با روشهای ایمونولوژی نمی‌توان این دو را از هم تفریق کرد. در صورتیکه با روش PCR می‌توان توکسین این دو باکتری را از یکدیگر متمایز نمود. با این روش همچنین می‌توان ۳۸ باکتری را در هر میکرولیتر بصورت PCRمستقیم(بدون گذراندن مراحل استخراج DNA) تشخیص داد(۸). PCR انجام شده بوسیله پرایمرهای فوق جهت نمونه‌های کلستریدیوم فالاکس، ک. پرفرنژنس، ک. کارنیس، ک. نوویی تیپ های A,B، ک. رموزوم، ک. ساب ترمیناله، ک. بایفرمنتانس، ک. اینوکوم و سویه واکسن ک. پرفرنژنس سه تیپ B,C,D نتایج مثبتی را نشان نداد(تصاویر ۱،۲). بنابراین ویژگی این روش با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آلفا توکسین جهت تشخیص ک. سپتیکوم بسیار بالا بوده و می‌توان آنرا بعنوان روشی صد در صد اختصاصی معرفی نمود. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه Takeuchi بر روی ۱۰ سویه از ک. سپتیکوم، ۴ سویه از ک. شوویی، ۲ سویه از هریک از تیپ‌های B,C,E ک. پرفرنژنس، تیپ A,B ک. نوویی، ک. همولیتیکوم، اکتینومیسس پیوژنس واستافیلوکوکوس اورئوس همخوانی دارد. همچنین این پرایمر با ژن آئرولیزین آ. هیدروفیلا، و همچنین با توکسین انواع متعددی از میکروبها شامل آلفا همولیزین آئروموناس هیدروفیلا، بتاهمولیزین آئروموناس سالموندیسیدا، همولیزین باسیلوس سرئوس، پرفرینژلیزین O از کلستریدیوم پرفرنژنس، لیستریولیزین از لیستریا مونوسیتوژنس، الوئولیزین از پنی باسیلوس الویی، بتاهمولیزین پزودوموناس پاسی موبیلیس، الفاهمولیزین استافیلوکوکوس اورئوس، بتاهمولیزین اس. اورئوس، استرپتولیزین D از استرپتوکوکوس کنیس، استرپتولیزین O از استرپتوکوکوس اکویی سیمیلیس و پنومولیزین استرپتوکوکوس پنومونیه هیچگونه همولوژی نداشت. با توجه به این

یافته‌ها بنظر می‌رسد که این روش شناسایی برای همولیزین ک.سپتیکوم اختصاصی باشد.

برای تشخیص کلستریدیوم سپتیکوم بروش PCR از ژنهای دیگری چون ژن تاژک (Felagellin gene) و همچنین 23s rDNA spacer region-16s نیز استفاده شده است(۶، ۵). از ژن توکسین سایر کلستریدیا چون نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینیوم، توکسین A و B کلستریدیوم دیفیسیل و توکسین‌های اصلی کلستریدیوم پرفرنژنس نیز در تشخیص بروش PCR این باکتریها کمک گرفته شده است(۹).

عملیات تشخیص باکتری بوسیله PCR مستقیم در آزمایشگاه در زمانی کمتر از ۴-۳ ساعت قابل انجام است. با توجه به حساسیت و ویژگی بالای PCR همچنین سرعت عمل آن با این روش می‌توان تمامی مناطق کشور را از نظر وجود انواع کلستریدیا مورد آزمایش غربالگری قرار داد و نقشه اپیدمیولوژی کشور را از نظر توزیع انواع کلستریدیا ترسیم نمود. همچنین با این روش می‌توان تنوع ژنتیکی حاکم بر هر نوع را نیز مورد بررسی قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری بخش‌های تحقیقات و تشخیص موسسه رازی مشهد و گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه که در انجام این پروژه اینجانب را یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

1. Hatheway, C.L., Johnson, E.A. (2000): Clostridium: The spore-bearing anaerobes, Toply and Wilson's Microbiology and microbial infections.9th edition. Albert Balows. Brain I Duwden.PP: 732-768
2. Imagawa, T., Dohi, Y., Higashi, Y. (1994): Cloning, nucleotide sequence and expression of a hemolysin gene of *Clostridium septicum*. FEMS Microbiology letters.117(3):287-292
3. Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. (1989): Molecular cloning a laboratory manual.2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.PP:14.2-14.29
4. Sambrook, J.,Russell, D.W. (2002): Molecular cloning a laboratory manual.3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press.PP: 8,18-8,96
5. Sasaki, K., Yamamoto, K., Kojima, A., Norimatsu, M. and Tamura, Y. (2000): Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region.Res Vet Sc.69 (3): 289-294
6. Sasaki, Y., Kojima, A., Aoki, H., Ogikubo, Y., Takikawa, N. and Tamura, Y. (2002): Polygenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *C.haemolyticum*, *C. novyi types A and B* and *C.septicum* based on the flagellin gene.Vet Mic.86: 257-267
7. Smith, L.DS. (1975): The pathogenic anaerobic bacteria. Thomas Books:109-115, 579-580
8. Songer, j. G. (1997): Molecular and immunological methods for the diagnosis of the clostridial disease. The clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. Academic press.PP: 491-501
9. Takeuchi, Sh., Hashizume, N., Kinoshita, T., Kaidoh, T. and Tamora, Y. (1997): Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. J Vet Med Sci.59 (9): 853-855
10. Wren, B.W., Mullany, P., Lamb, F.I. (1991): Genetics and Molecular Biology. Anearobic Microbiology a practical approach. Oxford University Press.PP: 145-161.