دوره شانزدهم ـ شماره ۳ ـ پاییز ۱۳۹۹
DOI: 10.22055/ivj.2019.172460.2119

آنتروتوکسمی در گوسفندان منطقه اهواز؛ مطالعه پاتولوژی، باکتریولوژی، سرولوژی و مولکولی

آرش احمدی‌رهنمون[۱]، صالح اسماعیل‌زاده[۲*]، بابک محمدیان[۲]، مسعود قربانپور[۳] و علیرضا قدردان مشهدی[۴]

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی پاتولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۳] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۴] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۹

چکیده

تیپ D *کلستریدیوم پرفرینجنس*، عامل بیماری حاد و کشنده‌ای به نام آنتروتوکسمی بوده که غالباً گوسفند و بز را درگیر می‌کند. هدف از این مطالعه، ارزیابی جنبه‌های پاتولوژی، باکتریولوژی، سرولوژی و مولکولی این بیماری در گوسفندان منطقه‌ی اهواز بوده است. بدین منظور در فاصله‌ی زمانی ۲۳ ماهه، ۲۰ رأس گوسفند مشکوک به آنتروتوکسمی، (بر پایه‌ی اطلاعات بالینی) به طور معمول کالبدگشایی شده و نمونه‌های لازم از آن‌ها جهت آزمایش‌های بعدی اخذ گردید. در ۵۰ درصد از دام‌ها مرگ ناگهانی به عنوان بارزترین یافته‌ی بالینی گزارش شده بود. معمول‌ترین نشانه‌های آسیب‌شناسی مشاهده شده در حیوانات مزبور خون‌ریزی اندوکارد (۷۰ درصد)، پنومونی بینابینی (۶۵ درصد)، ادم و خون‌ریزی مغزی (۶۰ درصد) و نکروز حاد لوله‌ای (۶۵ درصد) بود. علاوه بر این در ۵۰ درصد از دام‌های مزبور، گلوکوزاوری نیز به اثبات رسید. بررسی‌های معمول باکتریولوژیک بر روی محتویات روده، نشان‌دهنده‌ی جداسازی ۶ جدایه مشکوک به *کلستریدیوم پرفرینجنس* بود که بر پایه‌ی یافته‌های PCR، ۴ جدایه تیپ A و ۱ جدایه از هر یک از تیپ‌های C و D بودند. تشخیص توکسین در محتویات روده با استفاده از آزمون الایزای غیرمستقیم صورت پذیرفت که نتایج آن با یافته‌های PCR هم‌خوانی داشت. با فرض ضایعات مغزی و گلوکوزاوری به عنوان شاخص آنتروتوکسمی تیپ D، وقوع آنتروتوکسمی در حداقل ۵۰ درصد نمونه‌ها مورد گمان است که البته با یافته‌های دیگر آزمون‌ها، هم‌خوانی نداشت. یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده‌ی اهمیت تازه بودن نمونه‌ها در نتایج آزمون‌های قابل استفاده برای ردیابی *کلستریدیوم پرفرینجنس* و توکسین‌های آن، است. همچنین با توجه به سابقه‌ی واکسیناسیون در اغلب حیوانات مورد مطالعه، رعایت اصول واکسیناسیون در دامداری‌های محلی مورد تردید است.

کلمات کلیدی: آنتروتوکسمی، *کلستریدیوم پرفرینجنس*، الایزا، PCR، پاتولوژی

* نویسنده مسئول : صالح اسماعیل‌زاده ، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
E-mail: s_esmaeilzadeh@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مقدمه

آنتروتوکسمی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های گوسفند و بز در ایران و جهان است. این بیماری، خطرناک و کشنده بوده و هر ساله دامداری‌ها را مورد تهدید قرار می‌دهد. عامل بیماری به نام *کلستریدیوم پرفرینجنس* از گروه باسیل‌های گرم مثبت بی‌هوازی، غیرمتحرک، هاگ‌زا و کپسول‌دار است که در خاک و محتویات روده‌ی انسان و حیوانات زندگی می‌کند (Songer, 1996). انواع آنتروتوکسمی ناشی از این باسیل از نظر تظاهرات بالینی و پاتولوژی بر حسب نوع باکتری و توکسین‌های خاص تولیدی آن متفاوت است. سویه‌های این گونه بر اساس توانایی آن‌ها در تولید چهار توکسین کشنده آلفا[1]، بتا[2]، اپسیلون[3]، و یوتا[4] به پنج تیپ A، B، C، D و E تقسیم می‌شوند. تیپ D باکتری به عنوان شایع‌ترین عامل بیماری آنتروتوکسمی (قلوه نرمی[5]) در گوسفند و بز تلقی می‌شود (Uzal & Songer, 2008). این باکتری در انسان و دام‌ها مسئول ایجاد طیف وسیعی از بیماری‌های اغلب کشنده از جمله مسمومیت غذایی، قانقاریای گازی[6]، آنتریت نکروز دهنده و آنتروکولیت نکروز دهنده در اطفال و عفونت‌های سیستم گوارشی در دام‌ها است (Rood & Cole, 1991). بیماری‌زایی *کلستریدیوم پرفرینجنس* از سه راه عمده به انجام می‌رسد: اول، نکروز مخاط روده به واسطه‌ی توکسین باکتری و ایجاد آنتریت‌های هموراژیک، فیبرینی و نکروتیک. دوم، اثر ترشحی موضعی آنتروتوکسین و در نتیجه ایجاد اسهال و ضایعات اندک در مخاط روده و سوم جذب سیستمیک آنتروتوکسین و اثر در مناطق دورتر از روده (Uzal et al., 2016).

تاریخچه‌ی بیمار، علائم بالینی و یافته‌های کالبدگشایی در تشخیص آنتروتوکسمی در گوسفند و بز مفید بوده، اما معیار قابل قبول، برای تشخیص این بیماری شناسایی توکسین‌های باکتری عامل در محتویات روده است (Uzal, 2004). در تشخیص انواع تیپ‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* به طور گسترده از جستجوی توکسین‌های Cpa، Cpb و Etx به کمک روش الایزا (Uzal & Songer, 2008)، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Fayez et al., 2013) و نیز آزمایش خنثی‌سازی توکسین- آنتی‌توکسین[7] استفاده می‌شود (Bryan et al., 2013). به علاوه به منظور تشخیص بیماری، اندازه‌گیری گلوکز ادرار، تهیه‌ی گسترش مخاطی از روده و رنگ‌آمیزی گرم، بررسی هیستوپاتولوژی بافت مغز می‌تواند کمک‌کننده باشد (Uzal & Songer, 2008). آنتروتوکسمی غالباً درمان‌ناپذیر است لیکن با استفاده از واکسیناسیون، پیش‌گیری و مقابله با آن امکان‌پذیر خواهد بود (De la Rosa et al., 1997; Pilechian, 2013). مستندات موجود در آرشیو بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، بیان‌گر وقوع احتمالی آنتروتوکسمی در درصد قابل توجهی از دام‌های ارجاع شده به این بخش (بر اساس اطلاعات تاریخچه‌ای و کالبدگشایی) بود که برخی از آن‌ها علی‌رغم دو نوبت واکسیناسیون بر ضدِ آنتروتوکسمی (مستند به اظهارات صاحبان آن‌ها)رخ داده بودند. صرف نظر از عدم امکان بررسی صحت یا سقم اظهارات دامداران، شیوع غیرمعمول آنتروتوکسمی در سطح منطقه، لزوم انجام مطالعاتی در مورد چرایی این رخداد و علل مؤثر بر آن را طلب می‌نمود. بر همین اساس هدف از انجام این تحقیق، مطالعه‌ی جنبه‌های پاتولوژی، باکتریولوژی و مولکولی موارد ارجاعی مشکوک به بیماری آنتروتوکسمی در اهواز بوده است.

1- *Clostridium perfringens*Alpha-toxin**(**Cpa)
2- *Clostridium perfringens*Beta toxin(Cpb)
3- Epsilon toxin **(**Etx)
4- Iota toxin **(**Itx**)**
5- Pulpy kidney
6- Gas gangrene
7- Toxin-antitoxin neutralization test

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

در این مطالعه، در مدت زمان ۲۳ ماه (از بهمن ۱۳۹۴ تا آذر ۱۳۹۶)، تعداد ۲۰ رأس گوسفند ارجاعی به بیمارستان دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز با محدوده سنی ۲ ماه تا ۵ سال و مشکوک به آنتروتوکسمی (بر اساس یافته‌های بالینی و تاریخچه‌ای از جمله مرگ ناگهانی، اسهال، مشکلات تنفسی و ....) مورد بررسی قرار گرفتند. دام‌های مزبور، به شکل استاندارد کالبدگشایی شده و نمونه‌های بافتی از ارگان‌های مختلف از جمله روده‌ی باریک (ایلئوم)، کبد، کلیه، ریه (لوب دیافراگمی و عمدتاً سمت چپ)، قلب (بطن چپ) و مغز (به منظور بررسی کپسول داخلی، تالاموس، مغز میانی، مخچه و پایک‌های آن) تهیه و در بافر فرمالین ۱۰ درصد پایدار گردیدند. از این نمونه‌ها مطابق روش‌های استاندارد، مقاطع میکروسکوپی با ضخامت ۵ میکرومتر آماده شده و به روش هماتوکسیلین–ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. همچنین وجود قند در نمونه‌های تهیه شده از ادرار موجود در مثانه‌ی دام‌ها نیز با استفاده از نوار تشخیص قند بررسی گردید (Filho et al., 2009; Uzal & Songer, 2008).

به منظور جداسازی باکتری و جستجوی توکسین در محتویات روده، ۴–۳ گرم از محتویات پس از رقیق‌سازی با سرم فیزیولوژی تا زمان آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. از مایه‌ی رویی این نمونه‌ها (پس از رفع انجماد) پس از سانتریفیوژ و ته‌نشین شدن ذرات درشت، درون محیط کشت ژلوز خون‌دار حاوی ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نئومایسین کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی در انکوباتور قرار گرفت. پس از این مدت، کلونی‌های مشکوک از لحاظ ریخت‌شناسی (ایجاد همولیز دوگانه در محیط کشت) و رنگ‌آمیزی گرم و همچنین انجام آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز بررسی شدند. جدایه‌های مظنون، در محیط کشت ژلوز زرده‌ی تخم‌مرغ حاوی نئومایسین و محیط شیر تورنسل‌دار نیز کشت داده شده و تعیین هویت گردیدند (Wen & McClane, 2004). جهت کشت، نمونه‌ها به همراه جدایه‌ای از *کلستریدیوم پرفرینجنس* (به عنوان کنترل مثبت) در جار بی‌هوازی قرار داده شده و ضمن اتصال به دستگاه ایجاد کننده‌ی شرایط بی‌هوازی، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند (Quinn et al., 2013; Markey et al., 2013).

تعیین تیپ مولکولی جدایه‌های مشکوک

جهت استخراج DNA از نمونه‌ها از روش جوشاندن استفاده گردید. بدین منظور ۳–۲ پرگنه از باکتری‌های رشد کرده، به میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل شده و پس از ورتکس کوتاه، نمونه‌ها در ترموبلاک با دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵–۱۰ دقیقه قرار گرفتند تا باکتری‌ها لیز شوند. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و محلول رویی به عنوان DNA الگو پس از تعیین غلظت تا زمان انجام آزمون PCR در میکروتیوب‌های استریل و در دمای ۲۰– سانتی‌گراد نگهداری گردید (Ausubel et al., 2002). به منظور تأیید مولکولی جدایه‌های مشکوک، از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مربوط به توکسین آلفا باکتری استفاده شد (Heikinheimo & Korkeala, 2005). توالی پرایمرهای مربوطه در Table 1 درج شده است. واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر در چند مرحله با استفاده از Master Mix 2x (امپلیکون– دانمارک) انجام شد که اجزای آن در Table 2 درج گردیده است.

Table 1: Nucleotide sequence of primers used to determine the type of *Clostridium perfringens* isolates **(Heikinheimo & Korkeala, 2005)**

Target gene	Nucleotide sequence of primers	Size (bp)
Cpa	F: 5^1 – TGCATGAGCTTCAATTAGGT - 3^1 R: 5^1 – TTAGTTTTGCAACCTGCTGT - 3^1	381
Cpb	F: 5^1 – GCGAATATGCTGAATCATCTA - 3^1 R: 5^1 – GCAGGAACATTAGTATATCTTC- 3^1	195
Etx	F: 5^1 – GCGGTGATATCCATCTATTC - 3^1 R: 5^1- CCACTTACTTGTCCTACTAAC - 3^1	655
Itx	F: 5^1 – ACTACTCTCAGACAGACAG – 3^1 R: 5^1 – CTTTCCTTCTATTACTATACG – 3^1	443

Table 2: Components and amounts of PCR reaction for amplification of *Clostridium perfringens* **α toxin gene (Gharibi et al, 2017)**

The reaction components	Volume used in each reaction (Microliters)
Master Mix 2x	12/5
Forward Primer(10 Micromolar)	2/5
Reverse Primer (10 Micromolar)	2/5
DNA	3
PCR Grade Water	4/5
Total	25

در هر نوبت از آزمایش از DNA استخراج شده از *کلستریدیوم پرفرینجنس* تیپ A به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای هر واکنش PCR، در ابتدا موارد فوق با مقادیر ذکر شده (به استثنای DNA)، در مجاورت یخ به صورت مخلوط تهیه گردیده و سپس میزان ۲۲ میکرولیتر از مخلوط به درون میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری مخصوص PCR و عاری از DNase منتقل شدند. سپس به میزان ۳ میکرولیتر از DNA جدایه‌های مشکوک (حاوی حدود ۵۰ نانوگرم از الگو) به صورت جداگانه به هر میکروتیوب منتقل و مخلوط گردید. میکروتیوب‌ها به دستگاه ترمال‌سایکلر (Eppendorf, Germany) منتقل و برنامه‌ی دمایی طبق Table 3 اجرا شد. در صورت تولید محصولی به طول ۳۸۱bp نمونه *کلستریدیوم پرفرینچنس* در نظر گرفته شد (Heikinheimo & Korkeala, 2005).

Table 3: Thermal conditions of *Clostdridium perfringens* **Cpa gene amplification (Heikinheimo & Korkeala, 2005)**

Cycles	Levels	Number of cycles	Temperature °C	Time
The first cycle	Initial Denaturation	1	94	5 minutes
The Second cycle	Denaturation Annealing Elongation	35	94 55 72	60 Seconds 60 Seconds 60 Seconds
The Third cycle	Final elongation	1	72	10 minutes

به منظور تعیین ژنوتیپ *کلستریدیوم پرفرینجنس* (تعیین سایر توکسین‌های اصلی) از PCR چندگانه استفاده گردید. PCR چندگانه در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت که اجزای واکنش در Table 4 آورده شده است. در هر واکنش از پرایمرهای اختصاصی مربوط به توکسین‌های مربوط به *کلستریدیوم پرفرینجنس* (Table 1) استفاده می‌گردید.

Table 4: Ingredients of triplex PCR reaction to determine the type of *Clostridium perfringens* isolates (Heikinheimo & Korkeala, 2005)

The reaction components	The final volume (Microliter)
Master mix 2x	25
Cpb forward primer (10 Micromolar)	2
Cpb reverse primer (10 Micromolar)	2
Etx forward primer (10 Micromolar)	2
Etx reverse primer (10 Micromolar)	2
Ia forward primer (10 Micromolar)	2
Ia reverse primer (10 Micromolar)	2
DNA	5
PCR Grade Water	8
Total	50

از DNA استخراج شده *کلستریدیوم پرفرینجنس* (تیپ‌های A، D و C) به عنوان کنترل مثبت در آزمایش PCR چندگانه، استفاده گردید. برای هر واکنش PCR، در ابتدا مواد فوق با مقادیر ذکر شده (به استثنای DNA)، در مجاورت یخ به صورت مخلوط تهیه می‌گردید و سپس میزان ۴۵ میکرولیتر از مخلوط اجزای واکنش به درون میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری مخصوص PCR که عاری از DNase بودند، منتقل می‌شد. متعاقباً مقدار ۵ میکرولیتر از DNA جدایه‌ها به صورت جداگانه به هر میکروتیوب منتقل و پس از مخلوط کردن با محتویات درون میکروتیوب درب آن بسته و کدگذاری می‌گردید. میکروتیوب‌ها پس از آماده شدن به دستگاه ترمال سایکلر منتقل و برنامه‌ی حرارتی مشابه مرحله‌ی قبل (Table 3) اجرا می‌شد. در صورت فراهم بودن شرایط و تکثیر موفق، آغازگرهای Cpb، Etx و Ia به ترتیب قطعاتی به طول‌های، ۱۹۵، ۶۵۵ و ۴۴۳ را تکثیر می‌نمودند (Heikinheimo & Korkeala, 2005). از آن جایی که توکسین‌های اپسیلون و بتا نقش مهمی در تعیین تیپ‌های B و C *کلستریدیوم پرفرینجنس* دارند، واکنش PCR دوگانه با استفاده از پرایمرهای ژن‌های توکسین‌های بتا و اپسیلون، برای کمک به تیپ‌بندی جدایه‌ها نیز صورت گرفت. Table 5 اجزای واکنش فوق را نشان می‌دهد.

Table 5: Ingredients of PCR reaction for detection of *Clostridium perfringens* β and ε toxins (Gharibi et al, 2017)

Materials and concentrations required	Final volume (Microliters)
Master mix 2x	12/5
Cpb Forward primer (10 Micromolar)	2/5
Cpb Reverse primer (10 Micromolar)	2/5
Etx forward primer (10 Micromolar)	2/2
Etx reverse primer (10 Micromolar)	2/2
DNA	3/1
Total	25

تشخیص توکسین در محتویات روده با استفاده از الایزا

به منظور تشخیص وجود توکسین‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* در محتویات روده، از آزمون الایزا با استفاده از کیت تجاری آنتروتوکسمی با نام Bio-x/k290/2 ساخت بلژیک استفاده گردید. این کیت بر اساس الایزای غیرمستقیم طراحی شده بود و همزمان قادر به تشخیص توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون *کلستریدیوم پرفرینجنس* و نیز وجود خود باکتری در نمونه است. مراحل آزمایش الایزا طبق توصیه شرکت سازنده انجام گرفت و میزان جذب نوری حفره‌های پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر

نتایج

علائم بالینی

گوسفندان مورد مطالعه یا در حال احتضار (۱۲ رأس) بوده و یا به فاصله‌ی کوتاهی پس از مرگ (۸ رأس) جهت کالبدگشایی ارجاع شدند. غالب‌ترین علائم مشاهده شده در موارد در حال احتضار مرگ ناگهانی (۷۵ درصد)، مشکلات تنفسی (۵۰ درصد)، زمین‌گیری جانبی[1] (۵۰ درصد)، افزایش ترشح بزاق (۴۱/۶ درصد)، اسهال (۳۳/۳ درصد)، فلجی خفیف اندام‌های خلفی (۲۵ درصد) و تشنج (۱۰ درصد) بود. بیش‌ترین علائم در دام‌هایی که به فاصله‌ی کوتاهی پس از مرگ بررسی شدند نیز شامل مرگ ناگهانی (۷۵ درصد)، اسهال (۵۰ درصد)، فلجی خفیف اندام‌های خلفی (۲۵ درصد)، مشکلات تنفسی (۲۵ درصد)، زمین‌گیری جانبی (۲۵ درصد)، افزایش ترشح بزاق (۱۶/۶ درصد) در نظر گرفته شد. بر اساس اظهارات دامداران ۱۵ رأس از این دام‌ها سابقه‌ی واکسیناسیون بر ضد آنتروتوکسمی داشته و سایرین، فاقد چنین سابقه‌ای بودند.

پاتولوژی

در ۶ مورد (۳۰ درصد) از نمونه‌های روده کوچک، به لحاظ ظاهری پرخونی در سطح سروزی و گاهی تجمع گاز در نواحی درگیر روده جلب توجه می‌نمود. از نظر میکروسکوپی در این موارد، آنتریت نکروز دهنده، تخریب پرزها و گهگاه حضور پرگنه‌های باکتری در رأس پرزهای نکروز شده به چشم می‌خورد (Table 7 and Fig. 1). در سایر نمونه‌ها عارضه‌ی خاصی یافت نگردید. بررسی مقاطع کلیه نشان داد که ۸ مورد (۴۰ درصد) از آن‌ها به لحاظ ماکروسکوپی بزرگ و رنگ پریده به نظر می‌رسیدند. کلیه‌های مذکور به لحاظ میکروسکوپی به نکروز حاد لوله‌ای و ۵ مورد (۲۵ درصد) به گلومرولونفریت مبتلا بودند. در این موارد تخریب کامل و نکروز سلول‌های پوششی لوله‌ها به خصوص لوله‌های پروکسیمال مشاهده گردید (Fig. 2). ۱۳ مورد (۶۵ درصد) از ریه‌های مورد مطالعه،

1- Lateral Recumbency

به لحاظ ماکروسکوپی اغلب خیزدار، دارای قوامی کم و بیش لاستیکی و گوشتی بوده و در مجاری تعدادی از آن‌ها کف دیده می‌شد. از نظر میکروسکوپی در این ریه‌ها پنومونی بینابینی حاد تشخیص داده شد. افزایش ضخامت دیواره‌ی آلوئول‌ها به دلیل حضور سلول‌های آماسی (غالباً سلول‌های تک هسته‌ای) و همچنین پرخونی و نشت فیبرین در دیواره‌ی آلوئول‌ها مشاهده گردید (Fig. 3). در ۱۲ مورد از نمونه‌های مغز (۶۰ درصد) که از نظر ظاهری به پرخونی مبتلا بودند، در دید میکروسکوپی، ادم و خون‌ریزی به اثبات رسید (Fig. 4). عوارض یاد شده، کم و بیش در نواحی پنج‌گانه مغزی خصوصاً مغز میانی و تالاموس قابل مشاهده بود. در این مقاطع، ضایعات دیگری نظیر گلیوز منتشر[1](Fig. 5)، اسفنجی شدن[2] (Fig. 5) و در اندک مواردی کروماتولیز مرکزی[3] نیز به چشم می‌خورد. ضایعات قلبی به صورت خونریزی‌های سر سوزنی در ۱۴ نمونه (۷۰ درصد) و عموماً در زیر اندوکارد بطن چپ یافت گردید که در بررسی میکروسکوپی نیز به تأیید رسید (Fig. 6). در هیچ کدام از کبدهای مورد مطالعه عارضه‌ی خاصی مشاهده نشد.

Table 6: Histopathological findings in 20 sheep suspected to enterotoxemia

Tissue	Lesion	Number	Frequency (percentage)
Small intestine	Necrotizing enteritis	6	30
Kidney	Acute tubular necrosis	8	40
	Glomerulonephritis	5	25
Lung	Acute interestitial pneumonia	13	65
Brain	Hemorrhage & edema	12	60
Heart	Subendocardial hemorrhage	14	70

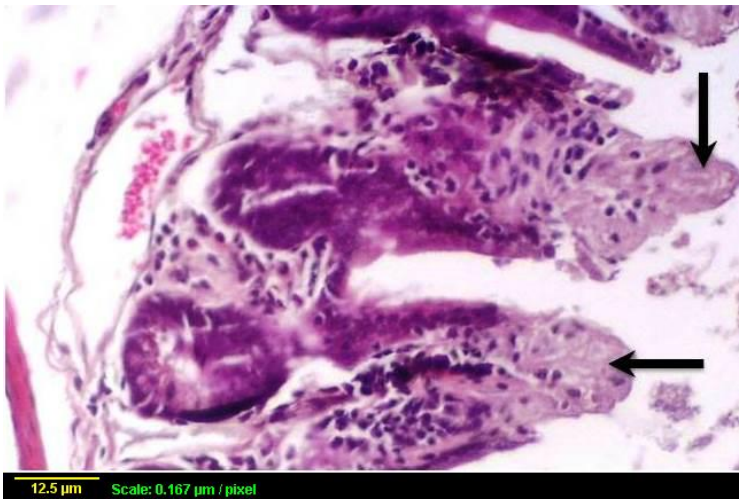

Figure 1: Tissue section of ileum showing apical necrosis of the villi (arrows); necrotizing ileitis. (H&E).

1- Diffuse Gliosis
2- Status Spongiosus
3- Central Chromatolysis

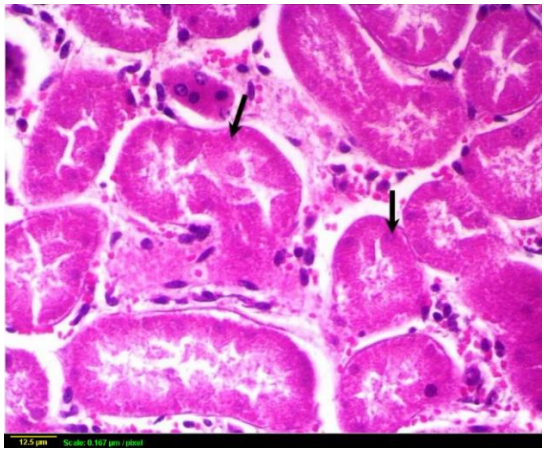

Figure 2: Tissue section of kidney showing cellular eosinophilia and karyolysis (arrows) of the proximal tubules; Acute tubular necrosis. (H&E)

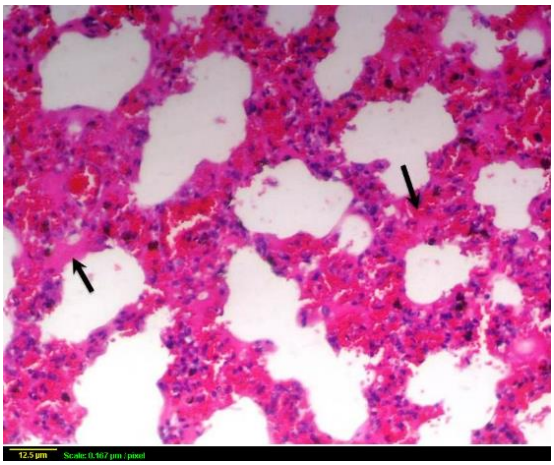

Figure 3: Tissue section of lung indicating thickened alveolar septa (arrows) due to hyperemia, fibrin exudation and infiltration of few inflammatory cells; Acute interstitial pneumonia (H&E)

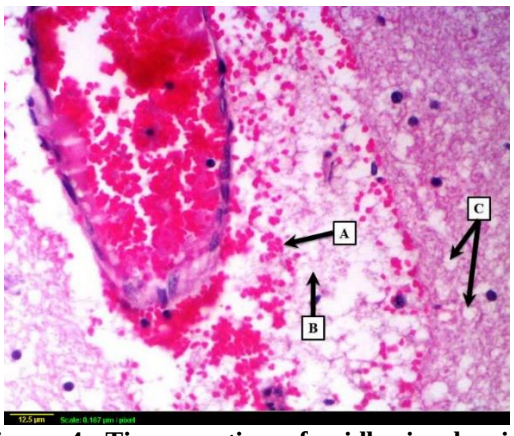

Figure 4: Tissue section of midbrain showing presence of RBC (A) and eosinophilic materials (B) in perivascular space and also status spongiosus (C) in white mater. (H&E).

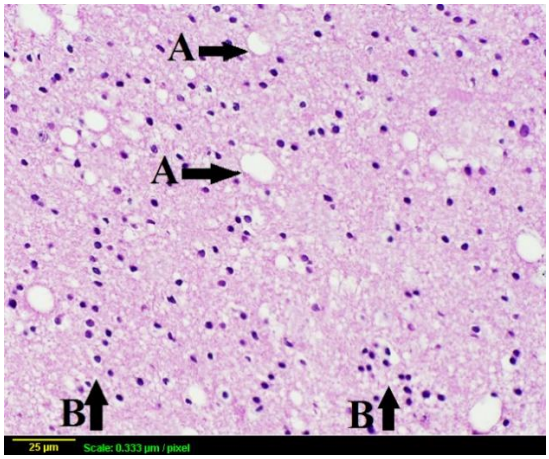

Figure 5: Tissue section of brain showing mild diffuse gliosis (B) and status spongiosus (A) (H&E).

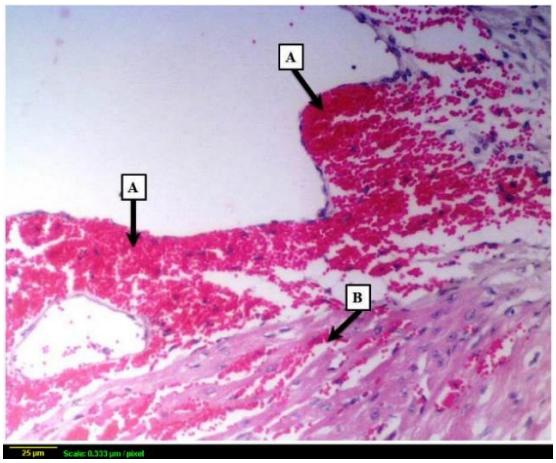

Figure 6: Tissue section of heart indicating subendocardial hemorrhage (A) and inter-cardiomyoctes hyperemia and hemorrhages. (H&E).

آزمایش حضور قند در ادرار

در ۱۰ مورد (۵۰ درصد)، وجود گلوکزاوری تشخیص داده شد.

آزمون PCR

از مجموع ۲۰ نمونه از محتویات روده‌ای تعداد ۶ جدایه مظنون به *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا گردید. با توجه به وجود توکسین آلفا در تمامی تیپ‌های باکتری یاد شده، جستجوی این توکسین با استفاده از پرایمرهای مربوطه نشان داد که تمامی این ۶ جدایه از نظر ژن این توکسین مثبت بوده و در واقع *کلستریدیوم پرفرینجنس* هستند (Fig. 7).

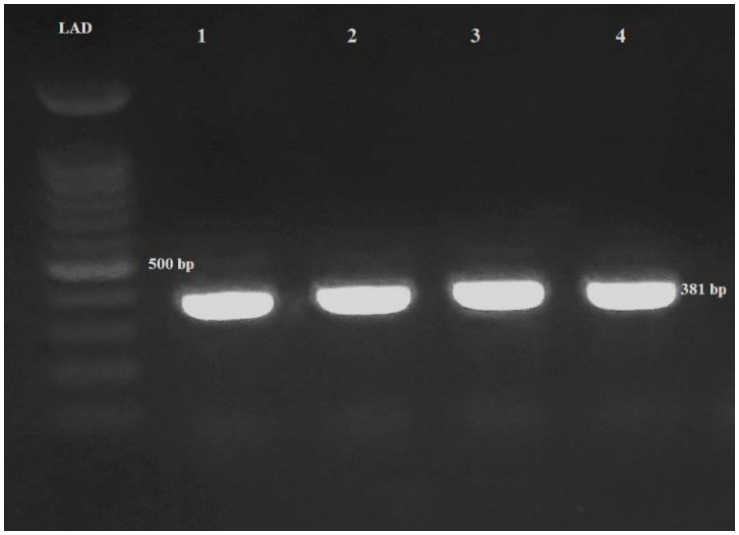

Figure 7: Electrophoresis of Monoplex PCR products for detection of *Clostridium perfringens* Cpa (alpha toxin) gene in a number of *Clostridium perfringens* isolates, LAD: DNA Ladder (100bp). Columns 1,2,3 & 4 Corresponding to isolates with cpa gene.

تعیین تیپ جدایه‌ها

به دنبال جستجوی ژن‌های مربوط به توکسین‌های اصلی باکتری یاد شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، حضور تیپ‌های A، B و C در نمونه‌های مورد بررسی به اثبات رسید (Fig. 8).

به منظور دقت بیش‌تر در تعیین تیپ، جدایه‌ها با PCR دوگانه، از نظر ژن‌های مربوط به Cpb و Cpe نیز بررسی شدند (Fig. 9) که با نتایج PCR سه‌گانه هم‌خوانی داشت.

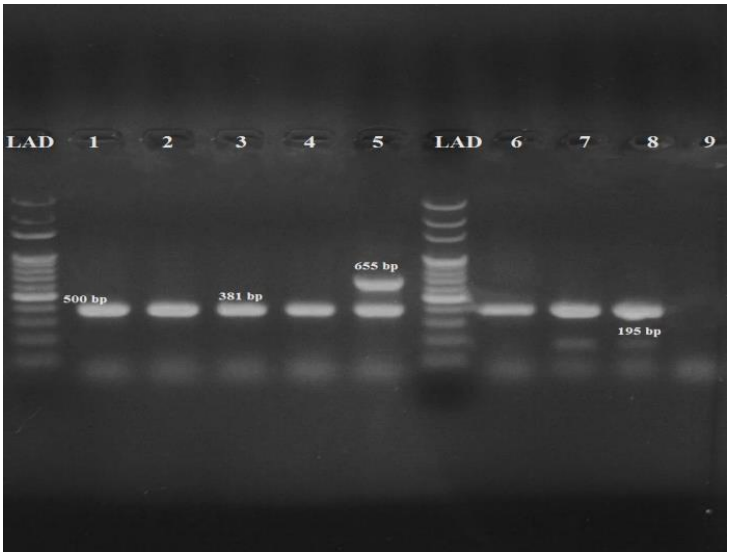

Figure 8: Electrophoresis of Monoplex PCR products for detection of Clostridium perfringens Cpa (alpha toxin) gene in a number of Clostridium perfringens isolates, LAD: DNA Ladder (100bp). Columns 1,2,3 & 4 Corresponding to isolates with cpa gene.

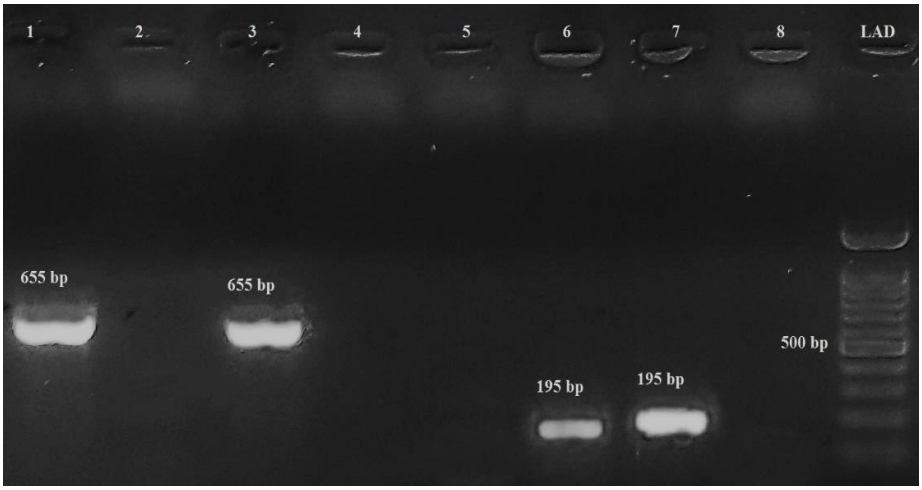

Figure 9: Electrophoresis of doubleplex PCR products for determination of Beta and Epsilon toxins in a selected *Clostridium perfringens* isolates. Lane 1 and 7 as positive control of Etx & Cpb genes respectively. Lane 2 and 8: negative controls. Lane 3: Etx gene (Type D) positive isolate. Lane 6: Cpb gene (Type C) positive isolate. LAD: DNA ladder (100bp).

در مجموع نتایج PCR نشان داد، که هر ۶ جدایه مشکوک، *کلستریدیوم پرفرینجنس* بوده و از نظر نوع تیپ، ۴ جدایه متعلق به تیپ A و ۱ جدایه متعلق به هر یک از تیپ‌های C و D هستند.

آزمون الایزا

آزمایش الایزای انجام شده نیز مشخص نمود که از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، تعداد ۶ مورد مثبت و ۱۴ مورد از نظر وجود باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* منفی هستند (Table 7).

Table 8 سابقه‌ی واکسیناسیون به همراه یافته‌های بالینی، پاتولوژی، باکتری‌شناسی، سرولوژی و مولکولی دام‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

Table 7: Results of antigen capture ELISA test for direct diagnosis of *Clostridium perfringens* and their alpha, beta and epsilon toxins in intestineal contents of sheep cases suspected to enterotoxemia

Types of toxins	Number	Frequency percentage
Cpa (Type A)	4	20
Cpa,Cpb (Type C)	1	5
Cpa, Etx (Type D)	1	5
Negative cases	14	70
Total	20	100

Table 8: History and laboratory findings of the 20 sheep cases suspected to enterotoxemia

Number	Age/Month	Vaccination	Related lesions[1]	Glucosuria	Bacteriological	Molecular	Serological
1	2	-	L,H	-	-	-	-
2	1	+	H	-	-	-	-
3	10	+	L	+	-	-	-
4	3	+	K,H	-	+	Type A	Cpa +
5	6	-	K,L,B,H	+	+	Type A	Cpa +
6	3	+	K,L,B,H	+	+	Type A	Cpa +
7	3	+	B,H	-	-	-	-
8	5	+	L,B	+	-	-	-
9	24	+	L,H	+	-	-	-
10	1	-	L,B,H	+	-	-	-
11	5	-	K,L,B,H	+	+	Type A	Cpa +
12	2/5	+	L	-	-	-	-
13	3	+	K,B,H	-	-	-	-
14	12	+	L,B,H	-	-	-	-
15	2	+	L,B	-	-	-	-
16	6	+	K,L,B	+	-	-	-
17	3	+	K,L,B,H	-	+	Type D	Cpa,Etx +
18	10	+	-	+	-	-	-
19	1	-	L,H	-	-	-	-
20	6	+	K,B,H	+		Type C	Cpa,Cpb +
Total	20	15	18	10	6	6	6

1- Expected pathological finding in enterotoxemia type D: Interstitial pneumonia, Acute tubular necrosis, Brain hemorrhage and subendocardial hemorrhage.
K: Kidney, L: Lung, B: Brain and H: Heart

بحث

کلستریدیوم‌ها به عنوان فلور در دستگاه گوارش انسان و دام وجود داشته و در صورت فراهم بودن شرایط رشد و تزاید به سرعت تکثیر یافته و مسبب بیماری‌های خطرناک و کشنده‌ای خواهد شد (Hadimli et al., 2012). از جمله این شرایط می‌توان به تغییر ناگهانی جیره مخصوصاً جیره‌ی حاوی کربوهیدرات‌های با تخمیرپذیری بالا، پرخوری، آلودگی شدید به کرم‌های نواری و درمان با فنوتیازون اشاره کرد (Uzal, 2004). هم اکنون به منظور پیش‌گیری و مقابله با بیماری‌های کلستریدیومی و خسارت‌های ناشی از آن در دام‌ها، واکسیناسیون به طور گسترده استفاده می‌شود (De la Rosa et al., 1997).

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۲۰ رأس گوسفند مشکوک به بیماری آنتروتوکسمی (از نظر بالینی) به لحاظ پاتولوژی، باکتری‌شناسی، سرولوژی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به لحاظ بالینی، به استناد گزارش‌های بخش داخلی دام‌های بزرگ و اظهارات صاحبان دام، مرگ ناگهانی، درگیری تنفسی، زمین‌گیری، اسهال، افزایش ترشح بزاق، فلجی اندام خلفی و تشنج دیده شده بود. بر همین اساس، رخداد احتمالی آنتروتوکسمی (تیپ D *کلستریدیوم پرفرینجنس*) در حداقل ۵۰ درصد از موارد (مرگ ناگهانی) مورد انتظار است. مطالعات نشان داده مرگ ناگهانی در نوع حاد بیماری و گاهی پس از علائم عصبی (تشنج) و درگیری تنفسی دیده می‌شود. اما دام‌هایی که مدت زمان بیش‌تری زنده می‌مانند علائمی نظیر افزایش ترشحات بزاقی، تنفس سریع، کمان پیکری، اسهال و زمین‌گیری را نشان می‌دهند. لازم به ذکر است، اسهال یافته معمولی در گوسفندان مبتلا به آنتروتوکسمی در نظر گرفته نمی‌شود (Uzal et al., 2016).

در بررسی‌های پاتولوژی، ۴۰ درصد نکروز حاد لوله‌ای، ۶۰ درصد ادم و خون‌ریزی مغز، ۶۵ درصد پنومونی بینابینی

حاد و ۷۰ درصد خون‌ریزی آندوکارد (به عنوان ضایعات احتمالی آنتروتوکسمی) تشخیص داده شد. در گوسفند، ضایعات پاتولوژی بافت مغز نظیر ادم اطراف عروقی شاخص بیماری آنتروتوکسمی در نظر گرفته می‌شود و در صورت زنده ماندن حیوان برای چند ساعت، آسیب‌های دیگر نظیر خون‌ریزی، تورم آکسون‌ها و آستروسیت‌ها به همراه دژنراسیون ماده‌ی سفید مغز مشاهده خواهد شد. لازم به ذکر است که آنسفالومالاسی کانونی متقارن[1] تنها در فرم تحت حاد بیماری قابل مشاهده است (Uzal, 2004). البته عدم وجود ضایعات مزبور دلیل کافی در ردّ بیماری نیست و عواملی نظیر، زمان مرگ و تأثیر توکسین بر بافت مغزی بر پیدایش آسیب‌های مغزی تأثیر دارند (Uzal, 2004). Filho و همکاران در سال ۲۰۰۹، با القای فرم تجربی آنتروتوکسمی ناشی از تیپ D *کلستریدیوم پرفرینجنس* در گاو به بررسی یافته‌های بالینی و پاتولوژی بیماری پرداختند. در مطالعه‌ی مزبور، بیش‌ترین تغییرات بافتی به عنوان ادم پروتئینی اطراف عروقی در مغز (ادم وازوژنیک[2]) و ادم داخل آلوئولی و بین لوبولی ریه گزارش گردید. Uzal و Kelly در سال ۱۹۹۸، در مطالعه‌ای مشابه، آسیب‌های بافتی در بزهای با سن ۱۶-۱۱ هفته را مورد بررسی قرار دادند. بیش‌ترین یافته‌های کالبدگشایی در این دام‌ها ادم ریوی، کولیت نکروز دهنده با غشای کاذب و ادم وازوژنیک مغزی بود. بر همین اساس در مطالعه‌ی حاضر، با توجه به نتایج مندرج در Table 8 و با در نظر گرفتن ضایعات مغزی به عنوان قطعی‌ترین شاخص پاتولوژی بیماری، رخداد آنتروتوکسمی در ۱۲ رأس (۶۰ درصد) از گوسفندان تحت بررسی، مورد انتظار است. در همین راستا نتایج اخذ شده از آزمایش قند ادرار (گلوکزاوری در ۵۰ درصد از نمونه‌ها)، نیز قابل توجه است. با این همه، نتایج باکتری‌شناسی، سرولوژی و مولکولی مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های پاتولوژی آن هم‌خوانی ندارد و آزمایشات سرولوژی و مولکولی، تنها یک مورد را به عنوان تیپ D *کلستریدیوم پرفرینجنس* تشخیص داده‌اند. نمونه‌ی مذکور به جز یافته‌ی گلوکزاوری، دیگر شاخص‌های آنتروتوکسمی را دارا بوده است. لازم به ذکر است که علی‌رغم ارزش گلوکزاوری در تشخیص آنتروتوکسمی تیپ D، لیکن این یافته، متغیر ثابتی نبوده و حضور یا عدم حضور آن در تأیید بیماری قطعیت ندارد (Uzal, 2004). به عنوان مثال، تجویز وریدی گلوکز (Uzal and Songer, 2008) و یا تخلیه‌ی ذخایر گلیکوژن کبدی قبل از مرگ دام (Gardner, 1973)، تفسیر نتایج گلوکزاوری را به چالش خواهد کشید. همچنین ردیابی Cpe در تشخیص تیپ D *کلستریدیوم پرفرینجنس* در حضور ضایعاتی مانند آسیب عروقی و FSE در بافت مغزی، ارزش چندانی ندارد (Uzal, 2004). به این ترتیب علت عدم ردیابی Cpe و تیپ D باکتری در حیوانات مشکوک به ابتلا به تیپ مزبور را بایستی به دلایل دیگری مثل عدم انجام آزمایش روی نمونه‌های تازه و نگهداری طولانی مدت آن‌ها در شرایط انجماد و نیز باقی ماندن محتویات در روده و جذب بافتی توکسین تولیدی باکتری نسبت داد (Bullen & Scarisbrick, 1957).

اگرچه برخی مطالعات حاکی از شیوع اندک تیپ D باکتری است (Ahsani et al., 2010; Jabbari et al., 2011; Hamad et al., 2010; Kalender et al., 2005) لیکن فراوانی تیپ مزبور در این مطالعه با نتایج دیگر مطالعات انجام گرفته در سطح منطقه مطابقت ندارد. به عنوان مثال: Pooladgar و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز به منظور شناسایی و تعیین تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس*، مطالعه‌ای در ۲۱۸ رأس گوسفند و بز مشکوک به آنتروتوکسمی در شهرهای مختلف خوزستان انجام دادند. این محققین پس از کشت نمونه‌ها، ۷۰ مورد *کلستریدیوم پرفرینجنس* از نمونه‌های مورد بررسی جدا کردند. در مطالعه‌ی ایشان، همچنین حضور توکسین‌های باکتری در محتویات روده ۴۶ حیوان با آزمایش الایزا بررسی شده و

1- Focal Symmetrical Encephalomalacia (FSE)
2- Vasogenic Edema

در ۱۵ مورد به اثبات رسید. همچنین تیپ D به عنوان فراوان‌ترین تیپ گزارش شد. در مطالعه‌ی یاد شده ۲۰ درصد از نتایج، مربوط به تیپ A، ۱۳/۳ درصد تیپ B، ۲۰ درصد تیپ C و ۴۶/۷ درصد مربوط به تیپ D بود. Gharibi و همکاران در سال ۲۰۱۷، مطالعه‌ای با هدف تعیین تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* با استفاده از PCR در گوسفندان منطقه‌ی اهواز به انجام رساندند. در مطالعه‌ی مذکور نمونه‌های مدفوع به صورت تصادفی از ۳۶۹ رأس گوسفند مشکوک به آنتروتوکسمی تهیه شده و پس از آماده‌سازی و کشت نمونه‌ها در ژلوز خون‌دار حاوی نئومایسین، ۵۶ جدایه باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جداسازی گردید. البته رقم مزبور پس از استخراج DNA و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، به ۵۴ مورد کاهش یافت. بر اساس نتایج مطالعه‌ی یاد شده شایع‌ترین تیپ‌های این باکتری در منطقه‌ی اهواز تیپ‌های C و D (به ترتیب ۴۴/۴۴ و ۲۹/۶۳ درصد) بوده و تیپ‌های A و B (۱۸/۵۲ و ۷/۴۲ درصد) در مراتب بعدی قرار دارند. علت تفاوت فراوانی تیپ C در مطالعه‌ی مذکور نسبت به مطالعه‌ی پیش رو، احتمالاً حساسیت بالای توکسین Cbp به تریپسین است زیرا توکسین مزبور چند ساعت پس از تولید در روده از بین خواهد رفت (Uzal, 2004). در سایر نمونه‌های مورد بررسی به لحاظ باکتری‌شناسی، سرولوژی و مولکولی تنها چهار مورد تیپ A و یک مورد تیپ C تشخیص داده شد. در این موارد نیز یافته‌های پاتولوژی و بالینی با نتایج ذکر شده هم‌خوانی ندارد. به عنوان مثال در هیچ یک از نمونه‌های مشکوک به تیپ A، اثری از ابتلای آن‌ها به یرقان دیده نشده و در سه مورد از آن‌ها ضایعات مغزی به عنوان شاخص آنتروتوکسمی تیپ D مشاهده گردید. ضایعات مغزی همچنین در یک مورد تیپ C نیز مصداق داشت. در بیش‌تر نمونه‌های آنتروتوکسمی شناسایی توکسین در محتویات روده در تشخیص نهایی مفید است، ولی در تیپ A این گونه نیست. روش شناسایی توکسین *کلستریدیوم پرفرینجنس* تا حد زیادی از نظر حساسیت و خاص بودن متنوع است. برای مثال بعضی از تست‌های الایزا حساسیت بالایی دارند و می‌توانند حجم کمی از توکسین آلفا را در روده‌ی حیوانات به ظاهر سالم شناسایی کنند. این عامل باعث بروز خطا در تفسیر نتایج می‌شود، زیرا غلظت توکسین آلفا در حیوانات بیمار و طبیعی نامشخص است (Uzal & Songer, 2008).

بر اساس اطلاعات کسب شده از دامداران، در ۷۵ درصد از دام‌ها واکسیناسیون علیه آنتروتوکسمی انجام گرفته بود. با توجه به این موضوع، رخداد احتمالی بیماری طبق علائم بالینی (و در ادامه ضایعات آسیب‌شناسی) قابل تأمل است. با فرض صحت اظهارات صاحبان دام، وقوع بیماری را می‌توان به عواملی نظیر تزریق نامناسب واکسن، عدم تکرار واکسن، عدم تزریق واکسن در میش‌های آبستن قبل از زایمان، شرایط نامناسب نگهداری واکسن (یخ زدگی و تابش مستقیم نور خورشید)، نسبت داد. لازم به ذکر است، کیفیت واکسن، حمل و نقل آن و تفاوت در پاسخ ایمنی دام‌های مختلف می‌تواند منجر به شیوع بیماری در گله شود (Uzal, 2004).

در مجموع نتایج این مطالعه عدم هم‌خوانی یافته‌های بالینی، پاتولوژی، باکتری‌شناسی، سرولوژی و مولکولی را نشان داد. این نکته پنهان نیست که، به منظور ردیابی باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* و توکسین‌های مربوط به آن، مدت زمان نگهداری نمونه‌ها جهت کشت و بررسی‌های سرولوژی و مولکولی آنتروتوکسمی بسیار حائز اهمیت است. در چنین شرایطی، قطعی‌ترین شاهد بیماری، یافته‌های آسیب‌شناسی و بالاخص عوارض مغزی در گوسفندان است. همچنین با توجه به سابقه‌ی واکسیناسیون (طبق اظهارات صاحبان دام) و رخداد احتمالی آنتروتوکسمی در حداقل نیمی از نمونه‌های مطالعه‌ی حاضر و بررسی‌های سایر محققین در سطح استان، می‌توان علت محتمل را بر عدم رعایت اصول واکسیناسیون در نظر گرفت. امید است یافته‌های این پژوهش فتح بابی در تشخیص و تحقیقات بیش‌تر در زمینه‌ی بیماری آنتروتوکسمی و عوامل زمینه‌ساز آن باشد.

تشکر و قدردانی

انجام این مطالعه بدون پشتیبانی مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز و نیز مساعدت و همراهی کارشناسان بخش‌های پاتولوژی، میکروبیولوژی و داخلی دام‌های بزرگ دانشکده دامپزشکی امکان‌پذیر نبود.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله، تعارض منافعی با یکدیگر ندارند.

منابع مالی

هزینه‌های این پژوهش از محل اعتبارات معاونت پژوهش و فنّاوری دانشگاه شهید چمران اهواز و در قالب پژوهانه اساتید راهنما و مشاورین پایان‌نامه تأمین گردیده است.

منابع

Ahsani, M.R., Mohammadabadi, M.R., & Shamsaddini, M.B. (2010). *Clostridium perfringens* isolate typing by multiplex PCR. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 16*(4): 573-578.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingstone, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. A., et al. (2002). *Short protocols in molecular biology* (5th Edition). John Wiley and Sons. New York. Pp: 1-15.

Bryan, M., Finola, L., Marie Ann, C., & Doris, M. (2013). *Clinical veterinary microbiology* (2nd Edition). Mosby Elsevier. London. Pp: 105-120.

Bullen, J.J., & Scarisbrick, R. (1957). Enterotoxaemia of sheep: experimental reproduction of the disease. *The Journal of Pathology and Bacteriology 73*: 495-509.

De la Rosa, C., Hogue, D.E., & Thonney, M.L. (1997). Vaccination schedules to raise antibody concentration against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. *Journal of Animal Science 75*(9): 2328-2334.

Fayez, M.M., Al Musallam, A., Al Marzoog, A., & Suleiman, M.B. (2013). Prevalence and toxinotyping of the toxigenic *Clostridium perfringens* in sheep with suspected enterotoxemia. *Nature and Science Journal 11*(8): 5-21.

Filho, E.J.F., Carvalho, A.U., Assis, R.A., Lobato, F.F., Rachid, M.A., Carvalho, A.A., et al. (2009). Clinicopathologicfeatures of experimental *Clostridium perfringens*type D enterotoxemia in cattle. *Veterinary Pathology 46*: 1213-1220.

Gardner, D.E. (1973). Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxemia basis of the hyperglycemic response. *Journal of Comparative Pathology 83*(4): 525-529.

Gharibi, D., Ghorbanpour, M., Haji Hajikolaei, M.R., & MahmoudiKohi, Z. (2017). Typing of *Clostridium perfringens* isolates from sheep in Ahvaz. *Iranian Veterinary Journal 13*(3): 75-86. (Inpersian)

Hadimli, H.H., Erganis, O., Sayin, Z., & Aras, Z. (2012). Toxinotyping of *C. perfringens* isolates by ELISA and PCR from lambs suspected of enterotoxemia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 36*: 409-415.

Hamad, M.A., Habra, A., & Allouz, A.K. (2010). Biotyping of *Clostridium perfringens* strains isolated from enterotoxemia cases in sheep using ELISA technique. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 17-24.

Heikinheimo, A., & Korkeala, H. (2005). Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium Perfringens* isolated from Finnish broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology 40*: 407-4011.

Jabbari, A.R., Afshari Far, S., Esmaelizad, M., PilehchianLangroudi, R., MoosawiShooshtari, M., & AbdolmohammadiKhiav, L. (2011). Molecular typing of toxigenic *Clostridium perfringens* isolated from sheep in Iran. *Archives of Razi Institute 66*(2): 81-86.

Kalender, R., Ertas, H.B., Cetinkaya, B., Muz, A., Arsalan, N., & Kilic, A. (2005). Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR.*Veterinarni Medicina 50*(10): 439-442.

Markey, B.K., Leonard, F., Archambault, M. Cullinane, A., & Maguire. D. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology* (2nd Edition). Mosby Elsevier. China, Pp: 215-238.

Pilechian, R. (2013). Molecular biology of *Clostridium perfringens* focusing on epsilon and beta toxin genes. *Journal of Veterinary Laboratory Research 5*: 5-19. (In Persian).

Pooladgar, A.R., Loni, R., Heidari, R., Pilechian Langrudi, R., & Ghaemmaghami, S.h. (2014). Detection and determination of various types of *Clostridiumperfringens* in sheep and goat by culture and ELISA method in Khuzestan Province. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences 5*(1): 32-4.

Quinn, P.I., Carter, M.E., Markey, B., & Carter, G.R. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology*. Vol 1, (2nd Edition), Mosbey. Pp: 191-208.

Rood, J.I., & Cole, S.T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological Reviews 55:* 621-648.

Songer, J.G. (1996). *Clostridial* enteric diseases of domestic animals.*Clinical Microbiology Reviews 9*: 216-234.

Uzal, F.A. (2004). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infection in sheep and goats.*Anaerobe*, *10*: 135-143.

Uzal, F.A., Plattner, B.L., & Hostetter, J. M. (2016). Alimentary system. in: Maxie(ed) ،*JubbKennedy&Palmers .Pathology of Domestic Animals* (6th ed., 189). Edinburgh: Elsevier.

Uzal, F.A., & Songer, J.G. (2008). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20*: 253-265.

Uzal, F.A., & Kelly, W.R. (1998). Experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in goats. *Veterinary Pathology 35*: 132-140.

Uzal, F.A., Kelly, W.R., Morris, W.E., Bermudez, J., & Biason, M. (2004). The pathology of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 16:* 403-411.

Wen, Q., & McClane, B.A. (2004). Detection of enterotoxigenic*Clostridium Perfringens* type A isolates in American retail foods. *Applied and environmental microbiology 70*(5): 2685-91.

Vol. 16, No. 3, Autumn, 2020
DOI: 10.22055/ivj.2019.172460.2119

Ovine Enterotoxemia in Ahvaz Region, Pathological, Bacteriological, Serological and Molecular studies

Arash Ahmadi Rahnemoon[1], Saleh Esmaeilzadeh[2*], Babak Mohammadian[2], Masood Ghorbanpoor[3] and Ali Reza Ghadrdan Mashhadi[4]

[1] PhD Graduated in Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 17.02.2019 Accepted: 09.06.2019

Abstract

Clostridium perfringens type D is the cause of an acute and fatal disease; called enterotoxemia which mostly infects sheep and goats. This study aimed to evaluate the pathological, bacteriological, serological and molecular aspects of this disease in sheep in city of Ahvaz. During 23 months, 20 suspected sheep (based on clinical history) were taken for routine necropsy and required specimens were prepared for complementary studies. In 50% of the cases, sudden death was reported as the most obvious clinical finding. The most common pathological lesions were endocardial hemorrhage (70%) interstitial pneumonia (65%) brain haemorrhage and edema (60%) and acute tubular necrosis (65%). Moreover, in 50% of the cases, glucosuria was also noted. The conventional bacteriological methods on the intestinal content showed 6 suspected strains of *C. perfringens* which in the PCR method, four were identified as type A and two as type C and D, (each one). The toxin detection in the intestinal content was performed using indirect Elisa test the results of which were consistent with PCR findings. Assuming the brain lesions and glucosuria as indicators of type D enterotoxemia, the disease was suspected at least 50% of the cases, which however didn't match with finding of the other tests, so it needs to be studied more. The findings of the present study revealed the importance of freshness of samples in the results of tests that can be used to trace *C. perfringens* and their toxins. Furthermore, considering the history of vaccination in most of the animals studied, the principles of vaccination in local farms are questionable.

Key words: Enterotoxemia, *Clostridium Perfringens*, Elisa. PCR, Pathology

[*] **Corresponding Author**: Saleh Esmaeilzadeh, Associated Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, E-mail: s_esmaeilzadeh@yahoo.com

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).