Research on Animal Production, Vol. 16, Issue 2, 2025 p: 138-145

Research Paper

# Identification of Alpha Toxin in Iranian *Clostridium novyi* Isolates from Slaughterhouse Samples

**Anahita Emadi[1], Seyed Ali Pourbakhsh[2], Mohsen Fathi Najafi[3], Mahmood Jamshidian[1] and Kiumars Amini[1]**

1- Ph.D., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Ph.D., Agricultural Research, Education and Extension Organization Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Ph.D., Agricultural Research, Education and Extension Organization Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran,
(Corresponding author: najafi99@yahoo.com)

Received: 17 April, 2024 Revised: 08 July, 2024 Accepted: 02 August, 2024

## Extended Abstract

**Background:** *Clostridium novyi* type B bacteria cause infectious gangrene in the liver (black disease) of sheep and goats. This bacterium produces a cytotoxin called alpha toxin. The spores of this bacterium enter the body of the animal through the digestive system and penetrate the liver. If the necessary conditions for bacterial growth are provided, including hypoxia and liver damage, such as the migration of parasite larvae, latent spores are activated, multiply, and secrete alpha and beta toxins. These toxins spread from the affected areas of the liver, are absorbed into the bloodstream, enter the vital organs of the body, and eventually lead to the death of the animal. Infectious gangrene in the liver is associated with economic losses, including the costs of sheep deaths, depreciation of affected farms, and health problems of infected carcasses. It is time-consuming to diagnose and isolate the cause of the disease with conventional methods; thus, there is a need for a simple and fast method to isolate and diagnose *C. novyi*. Therefore, this study was conducted for the molecular identification of alpha toxin in Iranian isolates of *C. novyi* from sheep liver.

**Methods:** In this study, 62 liver samples suspected of infectious liver gangrene (with necrotic and parasitic areas) were collected from Iranian slaughterhouses (Marand 5, Ahvaz 8, Shahryar 13, and Ilam 36 samples) during the last three months of 2018 and in the first three months of 2019. To isolate the bacteria, pieces from different parts of the liver were first separated and smeared, and the supernatant was collected as an extract by centrifugation. The pieces harvested from the livers were cultured in chopped liver broth and incubated under anaerobic conditions. For molecular confirmation, the DNA of the tissue extract samples was extracted using the phenol-chloroform method, and the DNA of the cultured samples was extracted using a kit. The isolates were investigated by the polymerase chain reaction (PCR) using alpha toxin-specific primers.

Isolates in which the alpha toxin gene of *Clostridium difficile* was detected were amplified based on the 16S rDNA sequence using specific primers. To isolate bacteria, positive samples were cultured in liver broth and placed under anaerobic conditions. To destroy non-spored bacteria (cleaning bacteria), the medium was heated at 100 °C for 10 min. Then, the extract was cultured on a blood agar medium, and the hemolytic colonies were cultured in a rich fermenter medium to increase growth and toxin production. Bacteria were evaluated using Gram staining to control Gram-positive and Gram-negative bacteria and by malachite green staining to determine the shape and type of spores. The alpha toxin gene was sequenced in positive isolates, and the nucleotide sequences of the alpha toxin gene in these isolates were compared with the equivalent sequences of isolates and vaccine strains that were previously sequenced and registered in GenBank.

**Results:** After cutting suspicious pieces of the liver with parasite contamination, parasite eggs were observed under a microscope. After incubation under anaerobic conditions, bacterial colonies with irregular shapes and unclear margins (polymorph) appeared on the agar medium and grew in the egg yolk agar medium, and Gram-positive, rod-shaped, endospore-forming bacteria were identified by staining. By performing PCR for the alpha toxin, a band was created in the range of 609 bp, and it was determined that seven samples belonged to *C. novyi*. PCR results using primers related to the alpha toxin gene present in type B *C. novyi* showed that out of 62

Copyright ©2025 Emadi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-02 ]

[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]

isolates suspected to be *C. novyi*, seven isolates contained the above gene. In addition, all liver extracts were negative, and the positive samples were all related to culture samples. The authenticity of the isolates in which the alpha toxin gene was detected was confirmed using PCR-16S rDNA. Sequencing of some of the isolates in which the alpha toxin gene of *C. novyi* was detected revealed a high similarity with the alpha toxin genomic structure among the isolates and the vaccine strain.

**Conclusion:** Isolation and identification of *C. novyi* are rarely successful because the samples must be transported to the laboratory under strict anaerobic conditions. In addition, because of the highly anaerobic nature of the bacteria, it is difficult to detect and isolate *C. novyi*. For this reason, reports of infectious gangrene in the liver are usually a possible diagnosis based on tissue pathology, fluorescent antibodies, or immunohistochemistry. *C. novyi* was difficult to determine. Considering that the most important pathogenic factor of *C. novyi* type B is alpha toxin, the alpha toxin gene primer was used to identify the isolate using molecular methods. The findings of the present study show that PCR can help in the diagnosis of *C. novyi* isolates by identifying alpha toxin. In summary, considering the limited information available in Iran about the contamination of sheep flocks with *C. novyi* and molecular confirmation and identification of local isolates, conducting research such as the present study in the future can help control the disease and reduce its possible losses in the Iranian animal husbandry industry. It is also useful for isolating Iranian isolates and storing them in the microbial collection in the country.

**Keywords:** *Clostridium novyi*, Isolation, PCR**,** α-toxin

**How to Cite This Article:** Emadi, A., Pourbakhsh, S, A., Fathi Najafi, M., Jamshidian, M., & Amini, A. (2025). Identification of Alpha Toxin in Iranian *Clostridium novyi* Isolates from Slaughterhouse Samples**.** *Res Anim Prod,* 16(2), 138-145. DOI: 10.61882/rap.2024.1456

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-04 ]

[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

# شناسایی توکسین آلفا در جدایه‌های ایرانی کلستریدیوم نووئی از نمونه‌های کشتارگاهی

آناهیتا عمادی[۱]، سید علی‌پوربخش[۲]، محسن فتحی‌نجفی[۳]، محمود جمشیدیان[۱] و کیومرث امینی[۱]

۱- دکتری، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دکتری، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
۳- دکتری، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران، (نویسنده مسوول: najafi99@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۹ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۲
صفحه ۱۳۹ تا ۱۴۶

## چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** باکتری کلستریدیوم نووئی نوع B عامل بیماری قانقاریای عفونی کبد (Black disease) در گوسفند و بز است. این باکتری سم سلولی به‌نام آلفا توکسین تولید می‌کند. اسپور این باکتری از طریق دستگاه گوارش وارد بدن دام شده، پس از نفوذ به کبد و در صورت فراهم شدن شرایط لازم رشد باکتری و از جمله کم‌اکسیژنی، آسیب کبدی مانند مهاجرت لارو انگل‌ها، اسپورهای نهفته فعال شده، تکثیر می‌یابند و توکسین آلفا و بتا را ترشح می‌کنند. این توکسین‌ها از نواحی از کبد آسیب‌دیده گسترش می‌یابند، از طریق جریان خون به اندام‌های حیاتی بدن وارد شده، و در نهایت مرگ دام را به‌دنبال خواهد داشت. بیماری قانقاریای عفونی کبد با خسارات اقتصادی شامل هزینه‌های مرگ و میر گوسفندان، استهلاک مزارع درگیر و مشکلات بهداشتی لاشه‌های آلوده همراه است که تشخیص و جداسازی عامل بیماری با روش‌های مرسوم وقت‌گیر است، لذا نیاز به یک روش ساده و سریع برای جداسازی و تشخیص کلستریدیوم نووئی وجود دارد. بنابراین، این مطالعه با هدف شناسایی مولکولی آلفا توکسین در جدایه‌های ایرانی کلستریدیوم نووئی از کبد گوسفند انجام‌گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، تعداد ۶۲ نمونه کبد مشکوک به بیماری قانقاریای عفونی کبد (دارای مناطق نکروزه و انگلی) از کشتارگاه‌های ایران (مرند ۵، اهواز ۸، شهریار ۱۳ و ایلام ۳۶ نمونه) طی سه ماه پایانی سال ۱۳۹۸ و سه ماه ابتدایی سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری شدند. برای جداسازی باکتری، ابتدا تکه‌هایی از قسمت‌های مختلف کبد جدا شدند و سلایه گردیدند و با انجام سانتریفیوژ، مایع‌رویی به‌عنوان عصاره جمع‌آوری شد. تکه‌های برداشت شده از کبد در محیط کشت مایع جگر (chopped liver broth) کشت داده شدند و در شرایط بی‌هوازی، گرم‌خانه گذاری گردیدند. برای تایید مولکولی، DNA نمونه‌های عصاره بافت با روش فنل-کلروفرم و DNA نمونه‌های کشت‌داده شده با استفاده از کیت، استخراج گردیدند. جدایه‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلفا توکسین، بررسی شدند. جدایه‌هایی که وجود ژن آلفا توکسین *کلستریدیم نووئی* در آنها تشخیص داده شد، جهت تأیید بر اساس توالی 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر گردید. جهت جداسازی باکتری، کشت نمونه‌های مثبت بر روی محیط بویون جگر انجام و در شرایط بی‌هوازی قرار گرفت. جهت از بین بردن باکتری‌های غیر اسپوردار (خالص کردن باکتری)، محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ °C حرارت داده شد. سپس، عصاره بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد و پرگنه‌هایی که همولیز دادند، در محیط فرمانتور غنی جهت افزایش رشد و توکسین‌زایی کشت داده شدند. باکتری با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم جهت کنترل گرم مثبت و منفی بودن باکتری و رنگ آمیزی مالاشیت گرین جهت بررسی شکل و نوع اسپور مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن توکسین آلفا در جدایه‌های مثبت تعیین توالی گردید و ردیف‌های نوکلئوتید ژن توکسین آلفا در این جدایه‌ها با توالی‌های هم‌ارز جدایه‌ها و سویه‌های واکسن که پیش از این تعیین توالی ژنومی شده و در بانک ژن ثبت گردیده‌اند، مقایسه شدند.

**یافته‌ها:** تخم انگل، پس از برش تکه‌های کبد مشکوک و دارای آلودگی انگلی در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. پس از گرم‌خانه گذاری در شرایط بی‌هوازی، با رشد باکتری، کلنی‌های باکتری با اشکال نامنظم با حاشیه‌های نامشخص (پلی‌مورف) بر روی محیط آگار و رشد در محیط egg yolk آگار ظاهر شدند و باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای، شکل دهنده اندوسپور در رنگ‌آمیزی شناسایی شدند. با انجام PCR برای توکسین آلفا، باندی در محدوده ۶۰۹ جفت باز ایجاد گردید و مشخص شد که هفت نمونه به کلستریدیوم نووئی تعلق داشتند. نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای مربوط به ژن توکسین آلفا که در تیپ B کلستریدیوم نووئی وجود دارد، نشان دادند که از ۶۲ جدایه مشکوک به کلستریدیوم نووئی، هفت جدایه واجد ژن فوق بودند. در ضمن، همه عصاره‌های کبد منفی بودند و نمونه‌های مثبت همگی مربوط به نمونه‌های کشت بودند. صحت جدایه‌هایی که وجود ژن توکسین آلفا در آن‌ها تشخیص داده شد، با PCR-16S rDNA تایید شد. با انجام تعیین توالی برخی از جدایه‌هایی که وجود ژن آلفا توکسین کلستریدیم نووئی در آن‌ها تشخیص داده شده بود، شباهت بالایی با ساختار ژنومی آلفاتوکسین در میان جدایه‌ها و سویه واکسن وجود داشت.

**نتیجه‌گیری:** جداسازی و شناسایی کلستریدیوم نووئی به‌ندرت موفقیت‌آمیز است زیرا باید نمونه تحت شرایط سخت بی‌هوازی سریع به آزمایشگاه منتقل شوند. علاوه بر این، به‌علت ماهیت بی‌هوازی باکتری، تشخیص و جداسازی کلستریدیوم نووئی به‌سختی امکان‌پذیر است. به‌همین دلیل، گزارشات بیماری قانقاریای عفونی کبد معمولاً تشخیص احتمالی مبتنی‌بر آسیب‌شناسی بافتی، آنتی‌بادی فلورسنت یا ایمنوهیستوشیمی هستند. تیپ کلستریدیوم نووئی به‌سختی تعیین می‌شود. با توجه به این‌که مهم‌ترین فاکتور بیماریزایی کلستریدیوم نووئی تیپ B توکسین آلفا است، لذا جهت شناسایی جدایه به‌روش مولکولی از آغازگر ژن توکسین آلفا استفاده شد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهند که روش PCR می‌تواند با شناسایی توکسین آلفا در تشخیص کلستریدیوم نووئی جدایه‌ها کمک کند. در جمع‌بندی یافته‌ها، با توجه محدودبودن اطلاعات موجود در ایران از آلودگی گله‌های گوسفند نسبت به کلستریدیوم نووئی و تأیید مولکولی و شناسایی جدایه‌های بومی، انجام تحقیقاتی نظیر مطالعه حاضر در آینده می‌تواند به کنترل بیماری و کاهش خسارت‌های احتمالی آن در صنعت دامپروری ایران کمک کند و همچنین جداسازی جدایه ایرانی و ذخیره در مجموعه میکروبی کشور مفید است.

**واژه‌های کلیدی:** α-توکسین، جداسازی، کلستریدیوم نووئی، PCR

## مقدمه

*کلستریدیوم نووئی* باسیلی بی‌هوازی، هاگ‌دار، و گرم مثبت است و فلور آن در خاک، کبد گوسفند و دستگاه گوارش برخی از حیوانات خشکی و آبزی وجود دارد (Feng *et al*., 2021). *کلستریدیوم نووئی* براساس نوع توکسین تولیدشده در سه نوع تقسیم‌بندی می‌شود، نوع بیماری‌زای A، B و نوع غیربیماری‌زای C. توکسین‌های آلفا و بتا جزء توکسین‌های اصلی باکتری هستند. نوع B باکتری عامل بیماری قانقاریای عفونی کبد (Black disease) در گوسفند و بز است. اسپور این باکتری از طریق دستگاه گوارش وارد بدن دام می‌شود و به کبد

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-02 ]

[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]

نفوذ می‌کند (Uzal *et al*., 2018). در صورت فراهم‌شدن شرایط لازم رشد باکتری، از جمله کم‌اکسیژنی، آسیب کبدی مانند مهاجرت لارو، انگل‌ها و اسپورهای نهفته فعال شده، تکثیر می‌یابند و توکسین‌های آلفا و بتا را ترشح می‌کنند. این توکسین‌ها از کبد آسیب‌دیده گسترش‌یافته، جذب جریان خون شده، از طریق آن به اندام‌های حیاتی بدن وارد می‌شوند و در نهایت مرگ دام را به‌دنبال خواهد داشت (Amimoto *et al*., 1998; Aronoff & Kazanjian, 2018; Saejung *et al*., 2011).

با توجه به اعمال سیاست واردات دام از کشورهای دیگر به ایران، ضعف در اجرای موثر مبانی قرنطینه و امکان ورود سویه‌های غیربومی باکتری همراه با دام، تشخیص دقیق بیماری، جداسازی و شناسایی عامل آن و آگاهی از میزان فراوانی موارد بیماری در استان‌های کشور در ارتقاء سیاست‌های مدیریت کنترل و پیشگیری از بیماری نقش به‌سزایی دارد. قانقاریای عفونی از بیماری‌های مهم و مطرح در دامپروری نشخوار کنندگان است و در صورت وقوع می‌تواند خسارات اقتصادی گسترده به دامداران تحمیل کند. تشخیص بیماری‌های کلستریدیایی و جداسازی عامل بیماری با روش‌های مرسوم بر اساس علایم بالینی، ریخت‌شناسی پرگنه کشت، تولید توکسین و روش‌های سرم‌شناسی است، اما این روش‌ها وقت‌گیر هستند، بنابراین برای تشخیص و جداسازی کلستریدیاهای بیماری‌زا به یک روش ساده و سریع مانند PCR نیاز است. در گونه‌های کلستریدیوم، ژن توکسین و ژن 16S rRNA اغلب به‌عنوان هدف برای PCR تشخیصی کاربرد داشته‌اند (Sasaki *et al*., 2000).

از آن‌جایی که *کلستریدیوم نووئی* دارای سه نوع است که نوع C بیماری‌زا نیست و همچنین *کلستریدیوم نووئی* NT، فاقد توکسین است، لذا انجام تست‌های مولکولی بر اساس ژن توکسین جهت تشخیص تفریقی ضروری است. توکسین آلفا کشنده و نکروتیک است و باعث ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی بر روی انواع سلول‌ها به‌خصوص سلول‌های اندوتلیال شده، باعث شکستن ساختار اسکلتی می‌گردد (Orrell & Melnyk, 2021).

وزن مولکولی بزرگ پروتئین حدود ۲۲۰ کیلودالتون است و حدود ۶۰۰۰ باز کدکننده دارد؛ از طرفی، دارای ساختار سوم حساس با ناپایداری زیاد است. به‌دلیل طول بزرگ آن، شناسایی کل ژنوم سخت است و نیاز به هزینه بالا برای تشخیص دارد. اما براساس گزارشات بانک ژن، این شناسایی می‌تواند برای بخش‌های مشترک گزارش‌شده براساس منابع بانک ژنی باشد تا در زمان مقایسه امکان بررسی تغییرات ژنومی وجود داشته باشد (Abdolmohammadi Khiav & Zahmatkesh, 2021). بنابراین، ارزیابی مولکولی جدایه‌ها به‌علت دقت و حساسیت بالا ضروری است. با توجه به این موضوع که با وجود شباهت‌های ژنومی میان جدایه‌ها ممکن است در میزان توکسین‌زایی و بیماری‌زایی جدایه‌ها تفاوت‌هایی باشد، لذا ضروری است که سویه‌های موجود در کشور شناسایی شوند و این سویه‌ها با سویه واکسنی مقایسه گردند (Ardehali *et al*., 1984). هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی *کلستریدیوم نووئی* و α–توکسین از نمونه‌های مشکوک کشتارگاهی با انجام PCR و تعیین توالی جدایه‌ها دارای ژن توکسین آلفا بود.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری و کشت نمونه‌ها

تعداد ۶۲ نمونه کبد گوسفندان مشکوک به بیماری قانقاریای عفونی کبد (دارای مناطق نکروزه و انگلی) از کشتارگاه‌های ایران (مرند ۵، اهواز ۸، شهریار ۱۳ و ایلام ۳۶ نمونه) طی سه ماه پایانی سال ۱۳۹۸ و سه ماه ابتدایی سال ۱۳۹۹ جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایشات در ۲۰ °C– نگهداری شدند. برای جداسازی باکتری، ابتدا تکه‌هایی از قسمت‌های مختلف کبد جدا شدند، در هاون با سرم فیزیولوژی سلایه گردیدند و سپس در دور g ۴۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به‌عنوان عصاره جمع‌آوری شد و تا انجام آزمایشات در ۲۰ °C– نگهداری گردید.

برای انجام کشت، ابتدا محیط کشت مایع جگر (chopped liver broth; HiMedia, USA) به‌مدت نیم ساعت بر روی شعله در دمای ۸۰ °C قرار گرفت، سپس در دمای محیط تا ۲۵ °C سرد شد و برای مرحله بعد آماده گردید. تکه‌های برداشت شده از کبد وارد محیط کشت شدند و در شرایط بی‌هوازی (جار بی‌هوازی) همراه با گاز پک در به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. مقداری از سوسپانسیون حاصل از کشت برای تست‌های بعدی در میکروتیوب در ۲۰ °C– نگهداری شد.

### تشخیص *کلستریدیوم نووئی* توسط PCR

DNA نمونه‌های عصاره بافت با روش فنل‌کلروفرم و DNA نمونه‌های کشت داده شده با استفاده از کیت (سینا ژن، ایران)، براساس دستورالعمل استخراج گردیدند (Jeong *et al*., 2020; Saejung *et al*., 2011; Sasaki *et al*., 2002). کمیت و کیفیت DNAهای استخراجی با اندازه‌گیری جذب آن‌ها توسط نانودراپ (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, Thermo Scientific) و ژل الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ به‌مدت یک ساعت بررسی گردیدند.

در این روش، آغازگر پیشرو F7 (5'-AATGGAGAGCTTCATTACAAAAAT-3') و آغازگر معکوس R7 (5'-TTCTTCCCAATTTCCATT TATATT-3') به‌کار گرفته می‌شوند که در جدایه‌های واجد این ژن، یک قطعه ژنتیکی به‌طول ۶۰۹ جفت باز تکثیر می‌شود (Gord-noshahri *et al*., 2016). جدایه‌هایی که وجود ژن آلفا توکسین *کلستریدیم نووئی* در آن‌ها تشخیص داده شد، جهت تایید بر اساس توالی 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (5'-TACCAGGAGGAAGCCAC-3' و 5'-GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT-3') تکثیر گردید.

برای انجام هر واکنش PCR، ابتدا مخلوط واکنش (Master mix; Ampicon) در حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. به این صورت که مقادیر لازم ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش و ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۲ میکرولیتر از DNA الگو و ۶ میکرولیتر از آب برای هر واکنش در تعداد نمونه‌ها آماده گردیدند. برای بهینه کردن واکنش از ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ یک مولار استفاده شد و نمونه کنترل مثبت (*کلستریدیوم نووئی*

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-02 ]
[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]

CN804) و کنترل منفی (به جای DNA، حجم معادل آن آب) تهیه گردید.

چرخه‌های PCR طبق شرایط دمایی شامل واسرشت‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۴ °C، سپس انجام ۳۶ چرخه متوالی شامل واسرشت‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۹۵ °C، اتصال به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۵۲ °C و طویل‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C انجام گرفت. در پایان، طویل‌سازی نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام‌گرفت.

**جداسازی باکتری**

یک میلی‌لیتر از نمونه‌های مثبت داخل میکروتیوب بر روی محیط بویون جگر کشت داده شد و این محیط برای مدت ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی قرار گرفت. جهت از بین بردن باکتری‌های غیر اسپوردار (خالص کردن باکتری) محیط کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ °C حرارت داده شد. سپس عصاره بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده شد و پرگنه‌هایی که همولیز دادند، در محیط فرمانتور غنی (شامل پپتون پروتئاز ۳٪-۴، عصاره مخمر ۰/۵٪، L-سیستئین ۰/۱٪، گلیسرول ۲٪، مالتوز ۰/۲ ٪ و توین ۸۰، ۰/۰۲ ٪) جهت افزایش رشد و توکسین‌زایی کشت داده شدند. از تک پرگنه‌های به‌وجود آمده برای رنگ‌آمیزی استفاده شد. باکتری با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم جهت کنترل گرم مثبت و منفی بودن باکتری و رنگ آمیزی مالاشیت گرین جهت بررسی شکل و نوع اسپور مورد ارزیابی قرارگرفت.

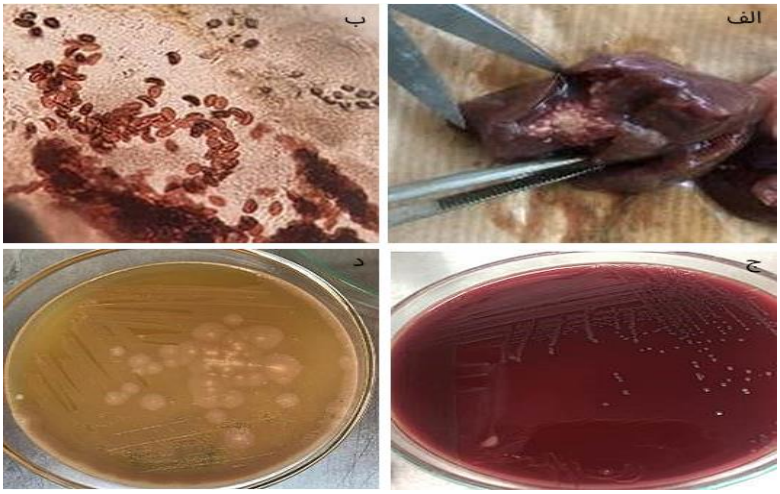
**تعیین توالی**

ژن توکسین آلفا در جدایه‌های مثبت تعیین توالی (نیاژن نور، ایران) گردید و ردیف‌های نوکلئوتید ژن توکسین آلفا در این جدایه‌ها با توالی‌های هم‌ارز جدایه‌ها و سویه‌های واکسن که پیش از این تعیین توالی ژنومی شده و در بانک ژن ثبت گردیده‌اند، مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

**جداسازی *کلستریدیوم نووئی***

پس از برش تکه‌های کبد مشکوک و دارای آلودگی انگلی (شکل ۱؛ الف)، تخم انگل در زیر میکروسکوپ (شکل ۱؛ ب) مشاهده شد. پس از ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در شرایط بی‌هوازی، با رشد باکتری، پرگنه‌های باکتری با اشکال نامنظم با حاشیه‌های نامشخص (پلی‌مرف) بر روی محیط آگار و رشد در محیط egg yolk آگار ظاهر شدند و باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای، و شکل‌دهنده اندوسپور در رنگ‌آمیزی شناسایی شدند (شکل ۱؛ ج و د).



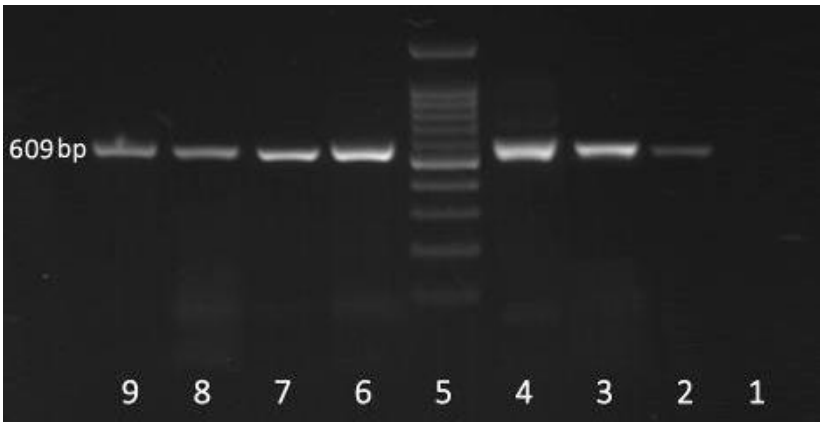

شکل ۱- برش کبد و مشاهده کبد انگلی (الف)؛ تخم انگل در زیر میکروسکوپ (ب)؛ کلستریدیا در شرایط کشت بی‌هوازی (ج: محیط آگار خون‌دار؛ د: محیط Egg youlk agar)

Figure 1. A section of the liver and parasites of the liver (a); Parasite eggs under the microscope (b); Clostridia in anaerobic culture conditions (c): blood agar medium; (d): egg yolk agar medium

**PCR**

با انجام PCR برای توکسین آلفا، باندی در محدوده ۶۰۹ جفت‌باز ایجاد گردید و مشخص شد که هفت نمونه به *کلستریدیوم نووئی* تعلق داشتند. نتایج PCR با استفاده از آغازگرهای مربوط به ژن توکسین آلفا که در تیپ B کلستریدیوم نووئی وجود دارد، نشان دادند که از ۶۲ جدایه مشکوک به *کلستریدیوم نووئی*، هفت جدایه واجد ژن آلفا توکسین بودند (شکل ۲). در ضمن، همه عصاره‌های کبد منفی بودند و نمونه‌های مثبت همگی مربوط به نمونه‌های کشت بودند.

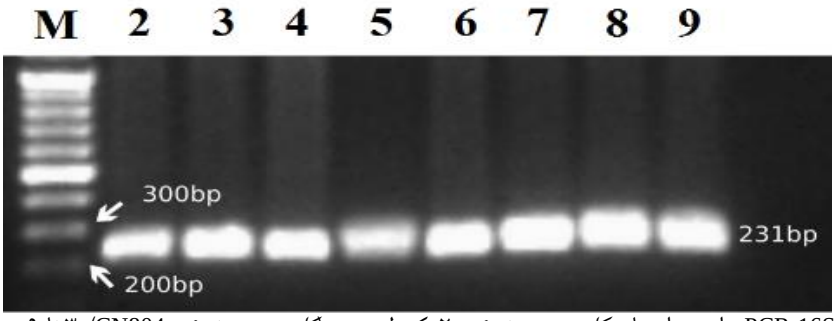
[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-04 ]
[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]




شکل ۲- PCR برای جدایه‌های کلستریدیوم. ۱: کنترل منفی؛ ۲: کنترل مثبت (*کلستریدیوم نووئی* CN804)؛ ۳، ۴، ۶-۹: جدایه‌ها؛ ۵: نشانگر DNA (۱۰۰ جفت‌بازی)

Figure 2. PCR for *Clostridium* isolates. 1: Negative control; 2: Positive control (*Clostridium novyi* CN804); 3, 4, 6-9: Isolates; 5: DNA size marker (100 base pairs)

صحت جدایه‌هایی که وجود ژن توکسین آلفا در آن‌ها تشخیص داده شد، با PCR-16S rDNA تأیید شد (شکل ۳).

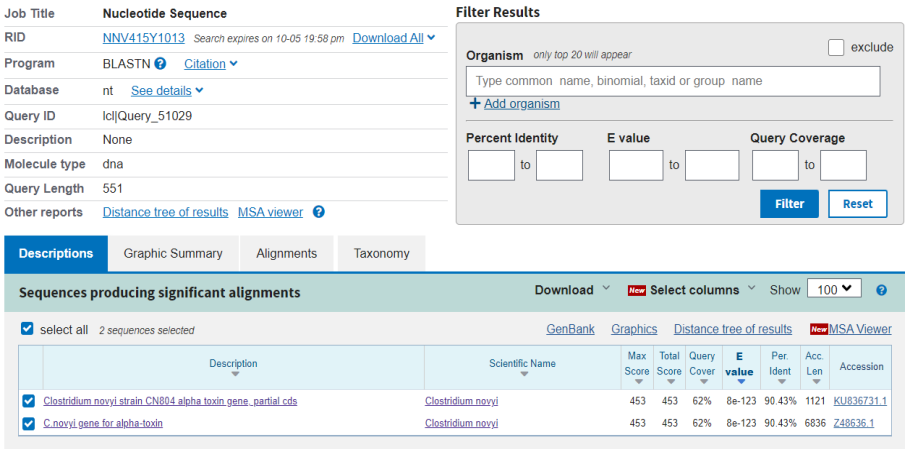



شکل ۳- PCR-16S rDNA برای جدایه‌های *کلستریدیوم نووئی*. ۲: کنترل مثبت (*کلستریدیوم نووئی* CN804)؛ ۳ تا ۹: جدایه‌ها؛ M: نشانگر DNA (۱۰۰ جفت‌بازی)

Figure 3. PCR-16S rDNA for *Clostridium novyi* isolates. 2: positive control (*Clostridium novyi* CN804); 3 to 9: isolates; M: DNA size marker (100 base pairs)

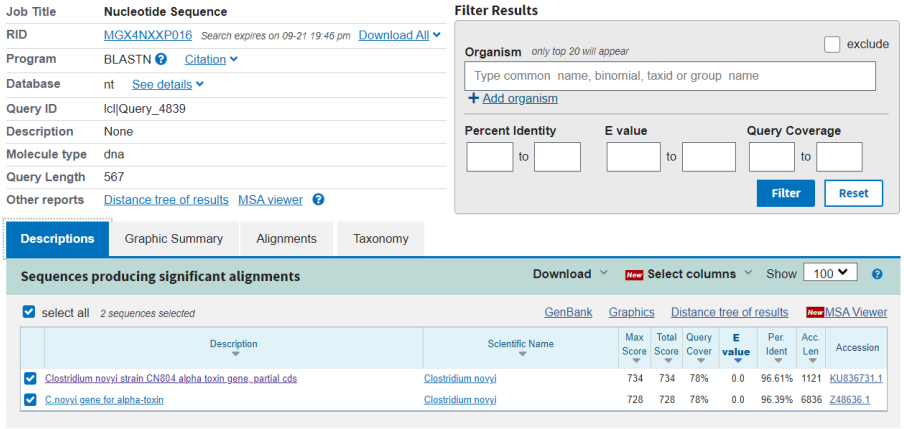
## تعیین توالی

با انجام تعیین توالی برخی از جدایه‌هایی که وجود ژن آلفا توکسین *کلستریدیم نووئی* در آن‌ها تشخیص داده شده بود، شباهت بالایی با ساختار ژنومی توکسین آلفا در میان جدایه‌ها و سویه واکسن وجود داشت (شکل ۴).




[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-02 ]

[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]




شکل ۴- تعیین توالی جدایه‌های کلستریدیم نووئی
Figure 4. Sequencing of *Clostridium novyi* isolates

بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی نه‌تنها به‌طور مستقیم و غیرمستقیم باعث مرگ و میر در دام می‌شوند، بلکه باعث کاهش رشد و تولید فراورده‌های دامی نیز می‌گردند. این بیماری‌ها اغلب در دامداری‌ها وجود دارند و موجب تلفات سنگین در گله‌های گوسفند و بز می‌گردند. براساس استانداردهای موجود، واکسیناسیون برای پیشگیری از بیماری‌های کلستریدیایی ضروری است و استفاده از واکسن بهترین راه مقابله با بیماری‌های کلستریدیایی است (Abdolmohammadi Khiav & Zahmatkesh, 2021).

جداسازی و شناسایی *کلستریدیوم نووئی* به‌ندرت موفقیت‌آمیز است زیرا باید نمونه تحت شرایط سخت بی‌هوازی سریع به آزمایشگاه منتقل شود. علاوه بر این، به‌علت ماهیت بسیار بی‌هوازی باکتری، تشخیص و جداسازی *کلستریدیوم نووئی* به سختی امکان‌پذیر است. به‌همین دلیل، گزارشات بیماری قانقاریای عفونی کبد معمولاً تشخیص احتمالی مبتنی بر آسیب‌شناسی بافتی، آنتی‌بادی فلورسنت یا ایمنوهیستوشیمی است. تیپ *کلستریدیوم نووئی* به‌سختی تعیین می‌شود (Nyaoke *et al*., 2018).

در مطالعه حاضر، تأیید اولیه باکتریایی با کشت در محیط اختصاصی و روش مولکولی انجام گرفت که از ۶۲ نمونه کبد گوسفند مشکوک (کشتارگاهی) از ایران، هفت جدایه درPCR و با توجه به نتایج توالی‌یابی، این جدایه‌ها به‌عنوان *کلستریدیوم نووئی* تیپ B تشخیص داده شدند.

با شناسایی آلفا توکسین و بررسی عوامل مؤثر بر تولید آلفا توکسین *کلستریدیوم نوویی* نوع B، مشخص شد که بهترین محیط مورد استفاده برای تولید آلفا توکسین، محیطی بود که حاوی عصاره مخمر در غلظت ۰/۵ درصد با عدم وجود تکه‌های گوشت و تنظیم pH بین ۷/۵ تا ۸ و گرم‌خانه‌گذاری به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت بود. این حالت منجر به رشد بالای باکتری و تولید توکسین در شرایط بهینه در دوره گرم‌خانه‌گذاری شد (Marwa *et al*., 2022).

با توجه به این که مهم‌ترین عامل بیماری‌زایی *کلستریدیوم نووئی* تیپ B توکسین آلفا است، لذا جهت شناسایی جدایه به‌روش مولکولی از آغازگر ژن توکسین آلفا استفاده شد که Nyaoke و همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز از آغازگر فوق جهت تشخیص *کلستریدیوم نووئی* تیپ B در اسب استفاده کردند (Nyaoke *et al*., 2018).

در سال ۲۰۰۰، ساساکی و همکاران برای تشخیص سریع و افتراقی بین کلستریدیوم‌های پاتوژن دخیل در گاز گنگرن از روش PCR براساس نواحی 16S-23S rDNA استفاده کردند. مشاهدات محققان نشان دادند که الگوهای PCR نواحی 16S-23S rDNA این پتانسیل را دارند که به‌عنوان نشانگر شناسایی کلستریدیای بیماری‌زا در گانگرن گاز استفاده شوند (Sasaki *et al*., 2000). در این تحقیق، جهت تأیید از پرایمر 16S rDNA استفاده گردید. نتایج ساساکی و همکاران (Sasaki *et al*., 2000) با نتایج توالی 16SrDNA تحقیق حاضر هم‌خوانی دارند.

جونگ و همکاران (Jeong *et al*., 2020) با به‌کارگیری هم‌زمان روش‌های بیوشیمیایی–مولکولی و بررسی اثر توکسین جدایه‌ها بر روی سلول VERO، یک مورد *کلستریدیوم نووئی* را در خوک در کره جنوبی شناسایی کردند. در تحقیق حاضر نیز به‌کارگیری تست‌های مولکولی در *شناسایی کلستریدیوم* نووئی تأیید گردید.

در جمع‌بندی یافته‌ها، با توجه محدود بودن اطلاعات موجود در ایران از آلودگی گله‌های گوسفند نسبت به *کلستریدیوم نووئی* و تایید مولکولی و شناسایی جدایه‌های بومی، انجام تحقیقاتی نظیر مطالعه حاضر در آینده می‌تواند به کنترل بیماری و کاهش خسارت‌های احتمالی آن در صنعت دامپروری ایران کمک کند و همچنین جداسازی جدایه ایرانی و ذخیره در مجموعه میکروبی کشور مفید است.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-02 ]
[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]

**References**

Abdolmohammadi Khiav, L., & Zahmatkesh, A. (2021). Vaccination against pathogenic clostridia in animals: a review. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), 284-294.

Amimoto, K., Sasaki, O., Isogai, M., Kitajima, T., Oishi, E., Okada, N., & Yasuhara, H. (1998). The protective effect of *Clostridium novyi* type B alpha-toxoid against challenge with spores in guinea pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 60(6), 681-685.

Ardehali, M., Darakhshan, H., & Moosawi, M. (1984). Production and standardized of *Clostridium oedematiens* vaccine in Iran. *Archives of Razi Institute*, 35, 23-26.

Aronoff, D. M. & Kazanjian, P. H., (2018). Historical and contemporary features of infections due to *Clostridium Novyi*. *Anaerobe*, 50, 80-84.

Feng, X., He, P., Zeng, C., Li, Y. H., Das, S. K., Li, B., Yang, H. F., & Du, Y. (2021). Novel insights into the role of *Clostridium novyi*-NT related combination bacteriolytic therapy in solid tumors. *Oncology Letter*, 21(2), 1-8.

Gord-noshahri, N., Fathi najafi, M., Makhdoumi, A. Majidi, B., & Mehrvarz, M. (2016). Identification and cloning of highly epitopic regions of *Clostridium novyi* alpha toxi. *Turkish Journal of Biology*, 40, 1219-1212.

Jeong, C. G., Seo, B. J., Nazki, S., Jung, B. K., Khatun, A., Yang, M. S., Kim, S. C., Noh, S. H., Shin, J. H., Kim, B., & Kim, W. I. (2020). Characterization of *Clostridium novyi* isolated from a sow in a sudden death case in Korea. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-8.

Marwa, A., Marwa, Y., & Hala ElSawy, A. (2022). Factors affecting on production of *Clostridium Novyi* type (B) Alpha Toxin. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, 7(2), 53-57.

Nyaoke, A. C., Navarro, M. A., Beingesser, J., & Uzal, F. A. (2018). Infectious necrotic hepatitis caused by *Clostridium novyi* type B in a horse: case report and review of the literature. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30(2), 294-299.

Orrell, K. E., & Melnyk, R. K. (2021). Large clostridial toxins: Mechanisms and roles in disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(3), 1-9.

Saejung, C., Hatai, K., Wada, S., Kurata, O., & Sanoamuang, L. (2011). Clinical observations of black disease in fairy shrimps, *Streptocephalus sirindhornae* and *Branchinella thailandensis*, from Thailand and pathogen verification. *Journal of Fish Diseases*, 34(12), 911-920.

Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A laboratory manual. 4th edition, Volume 1-4.

Sasaki, Y., Kojima, A., Aoki, H., Ogikubo, Y., Takikawa, N., & Tamura, Y. (2002). Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium Chauvoei*, *Clostridium Haemolyticum*, *Clostridium Novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Veterinary Microbiology*, 86(3), 257-267.

Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Norimatsu, M. & 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. *Research in Veterinary Science*, 69, 289-294.

Uzal, F. A., Navarro, M. A., Li, J., Freedman, J. C., Shrestha, A., & McClane, B. A. (2018). Comparative pathogenesis of enteric clostridial infections in humans and animals. *Anaerobe*, 53, 11-20.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-09-04 ]

[ DOI: 10.61882/rap.2024.1456 ]