۱. پاستورلا مولتوسیدا

مقدمه

پاستورلا مولتوسیدا باکتری کوکوباسیل گرم منفی، غیرمتحرک و غیر همولیتیک است که به خوبی می تواند در محیط های غنی رشد نماید. گونه های پاستورلا مولتوسیدا اسپور تولید نمی کنند، در حالی که بسیاری از جدایه ها تولید کپسول می کنند، که نقش مهمی در بیماری زایی پاستورلا مولتوسیدا ایفا می کند. پاستورلا مولتوسیدا اولین بار در سال ۱۸۷۸ در بیماری وبای مرغان یافت شد و در سال ۱۸۸۰ توسط لوئی پاستور جداسازی شد و به افتخار او پاستورلا نامیده شد. این باکتری گرم منفی به عنوان عامل بسیاری از بیماری های مهم اقتصادی در طیف گسترده ای از میزبان ها شناخته شده است.

گونه های پاستورلا مولتوسیدا بر اساس موقعیت کپسول شان به سروگروپA ، B، D، E، Fو ۱٦ سروتیپ های سوماتیک براساس لیپو پلی ساکارید (LPS) طبقه بندی شده اند. وبای گاو و گاومیش بیماریهای مهمی در گوساله ها و بره ها ایجاد کرده و بیشتر در کشورهای آسیایی و استرالیا دیده میشود، گونه هایی که به طور معمول وبای گاو و گاومیش را ایجاد می کند به سروتیپ های Bتعلق دارد (٥). استقرار سامانه تهیه و نگه داري میکروارگانیسم هاي مورد استفاده در تولید واکسن و فرآورده هاي بیولوژیك اصل مهم و حیاتي در ساخت و کنترل کیفیت این فرآورده ها محسوب مي شود و به منظور پیشگیري از بروز خصوصیات ناخواسته در تولید فرآورده هاي بیولوژیك به دنبال کشت و پاساژهاي مکرر، بایستي از سوش ها و بذرهاي استاندارد و بر پایه Seed lot system استفاده گردد. استقرار چنین سیستمي به تولید کننده این اطمینان را خواهد داد که همواره جمعیت سلولي و سوش ها با کیفیتي که منطبق با استانداردهاي بین المللي مي باشد در اختیار دارد .

تمامي سازنده هاي واکسن و فرآورده هاي بیولوژیکي به منظور افزایش کارایي و کیفیت محصولات خود از طرف سازمان هاي نظارتي ملي و بین المللي ملزم شده اند که سوش هاي اولیه مورد استفاده در تولید فرآورده هاي بیولوژیکي را با خصوصیات تعریف شده و منطبق با آخرین استانداردهاي جهاني و مطابق با الزامات GMP در اختیار داشته باشند.

هم اکنون سازنده هاي تراز اول و داراي برند در ساخت واکسن از جمله Merck و Novartis و ... چنین سیستمي را در سایت هاي تولیدي خود مستقر نموده اند. در ایران نیز با توجه به محدود بودن سازندگان فرآورده هاي بیولوژیك و همچنین نو پا بودن موضوع بیوبانك و استقرار Seed lot system به شکل مدون و جامع و در برگیرنده پروتکل هاي سازمان هاي نظارتي و کنترلي، اقدامي صورت نپذیرفته است.

خانواده پاستورلاسه

بر اساس مطالعات انجام شده تاکنون، ۱۳جنس مهم در خانواده پاستورلاسه شناسایی شده اند که در (جدول۱-۱) آورده شده است (٦.(

جدول (۱- ۱) طبقه بندی خانواده پاستورلاسه

No	Genes	References
1	*Actinobacillus*	**Christensen & Bissgarad, 2003**
2	*Haemophilus*	**Broom & Sneath, 1981**
3	*Lonepinella*	**Osawa et al , 1995**

4	*Pasteurella*	**Mutter et al , 1985**
5	*Mannheimia*	**Angen et al , 1999**
6	*Phocoenobacter*	**Foster et al , 2000**
7	*Gallibacterium*	**Christenson et al , 2003**
8	*Histophilus*	**Angen et al , 2005**
9	*Volucribacter*	**Christensen et al , 2005**
10	*Avibacterium*	**Blackall et al , 2005**
11	*Nicoletella*	**Kuhnert et al , 2004**
12	*Aggregatibacter*	**Blackall et al , 2005**
13	*Biberestinia*	**Blackall et al , 2005**

جنس های پاستورلا و منهمیا به خانواده پاستورلاسه همراه با جنس های دیگر مانند هموفیلوس و اکتینوباسیلوس تعلق دارند. گونه های پاستورلا و منهمیا کوچک (۰/۳_۱/۰ میکرومتر در عرض و ۱/۰ _۲/۰ میکرومتر در طول)، بی هوازی اختیاری، کوکوباسیل گرم منفی یا میله ای هستند(شکل۱-۱). آن ها بدون حرکت، بدون اسپور، تخمیر کننده، به طور کلی اکسیداز مثبت (به جزء پاستورلا دگماتیس)، کاتالاز مثبت (به جزء پاستورلا کابالی) و غیرهمولیتیک (به جزء منهمیا همولیتیکا) می باشند.

اگر چه در محیط های مغذی معمولی رشد می کنند، ولی از نظر تغذیه ای سخت رشد بوده و بهترین رشد را روی محیط های مکمل با سرم و خون یا شکلات آگار دارند. بیشتر آنها قادر به رشد روی محیط های مورد استفاده برای انتروباکتریاسه نمی باشند، به جزء منهمیا همولیتیکا که کلنی های ریز روی مک کانکی آگار تولید می کند.

زیستگاه طبیعی

باکتری های متعلق به جنس های Pasteurella, Mannheimia, Bibersteinia و Avibacterium در سراسر جهان در طیف گسترده ای از میزبان ها توزیع شده اند. آن ها تمایل به دستگاه گوارش و دستگاه تنفسی حیوانات و یا انسان ها دارند. بیشتر آن ها روی عضوهای موکوسی از دستگاه تنفسی فوقانی و یا روده ای حیوانات، انسان ها و پرندگان هستند. میزان ناقلین برای گونه های مختلف تا حد زیادی متفاوت است. بسیاری از آن ها پاتوژن های فرصت طلب هستند و تنها تحت شرایط خاصی بیماری ایجاد می کنند. به طور قابل توجه، پاستورلا مولتوسیدا می تواند در آب به مدت یک سال و همچنین در مواد آلی برای مدت طولانی زنده بماند (۷.(

تاریخچه

از زمان جدا سازی باکتری عامل وبای طیور توسط لوئی پاستور، تاکنون پیشرفت هاي شگرفي در راه شناسايي اين ارگانيزم صورت پذيرفته است. پس از پاستور كه اين ارگانيزم را از طيور جدا كرد دانسته شد كه باسيل عامل وباي طيور نمي‌تواند

چيزي جداي از عوامل سپتي سمي خرگوش، طاعون خوك و پنوموني گاوان باشد (شكل۱-۲). مشخصات يكسان اين ارگانيزم ها و شباهت بيماري هايي كه توسط آن ها در حيوانات متنوع ايجاد مي‌گردد، موجب گشت تا هووپ در سال ۱۸۸٦ آن ها را تحت نام مشترك Bact.Septicemiae hemorhagicaeدرآورد (۸.(

Trevisan سال بعد بدليل شباهت عوامل بيماري هاي ايجاد شده توسط اين ارگانيزم آنها را در يك جنس جاي داده و به افتخار پدر ميكروب شناسي جنس مذكور را Pasteurella ناميده و بيماري هاي ايجاد شده توسط اين باكتري ها را Pasteurellosisنام نهاد. اگر چه عوامل جدا شده از ميزبان هاي مختلف از نكته نظر مورفولوژيكي و بيوشيميايي تفاوت قابل ذكري نداشتند اما فلوگر بسته به ميزباني كه عامل را از آن جدا نموده بود سيستم نام گذاري خاصي را در خصوص باكتري هاي اين گونه به كار برد. بدين ترتيب باكتري هاي طيور، خوكي، گاوي، گوسفندي، خرگوشي نام گذاري گرديد. از آنجائيكه شيوه هاي شناسايي باكتري ها در آن روزگاران هنوز قادر به تفكيك بين باكتري هاي مورد نظر نبود لذا Kitt پيشنهاد كرد كه نام گونه‌هاي مختلف را تحت يك گونه واحد و به عنوان پاستورلا مولتوسيدا جمع آورند. اين پيشنهاد مقبول افتاده و تا به امروز در خصوص سويه هاي مختلف اين گونه باكتريايي به كار مي رود (۹). موور ، پاستورلا مولتوسيدا را به عنوان فلور طبيعي از مخاطات طيف وسيعي از حيوانات شامل گاو، گوسفند، خوك، سگ و گربه جدا كرد. اين مطالعه ثابت كرد كه گونه‌هاي جدا شده از عفونت حاد در گاو در خرگوش بيماري زايي چنداني ندارد. از آن روز تلاش هاي بسيار فراواني براي درك خصوصيات باكتري و طبقه بندي آن انجام يافته است. اولين تلاش ها در اين خصوص بر پايه خصوصيات كلني از سويه هاي مختلف جدا شده استوار گرديد. بر همين اساس پاستورلا مولتوسيدا به سه دسته تقسيم مي‌شوند :

دسته اول: باكتري ها با كلني موكوئيدي بودند كه اندازه بزرگ و بافتي نرم داشته در محيط مايع نيز رسوب چسبناكي را دارا می باشند. اين كلني ها براي موش قدرت بيماري زايی متوسطي را دارا مي‌باشند.

دسته دوم: از كلني هاي صاف فلورسنتي هستند كه اندازه اي متوسط داشته و قوامي محكم را شامل مي‌شوند. در محيط مايع به صورت منتشر رشد مي يابند و حدت بالايي را براي موش دارند.

دسته سوم: كلني خشن (آبي) با اندازه اي كوچك و قوامي سخت را شامل مي‌شوند و تمايل دارند در محيط بصورت خودبخود جمع شوند ، اعضا اين دسته حدت كمي را براي موش دارند(۱۰ .(

كم كم روش هاي آگلوتيناسيون، پرسيپتاسيون و تورم كپسولي نيز براي تعيين تيپ باكتري مذكور مورد استفاده واقع گرديد. بر همين پايه روبرت آنها را در چهار گروه ۱، ۲، ۳، ٤ قرار داده و كارتر در چهار گروهA ، B، C، Dطبقه بندي كرد. اگر چه روش روبرت تقريبا هم ارز روش كارتر بود اما نمي‌توانست بين تيپ B و D روش كارتر تمايز قائل گردد. اين امر موجب مقبوليت بيشتر روش كارتر گرديد.

روش كارتر كه بر اساس هماگلوتيناسيون غير مستقيم استوار بود. پاستورلاها را در ٤ تيپA ، B، C، Dقرار داد. اقتصادي بودن بيشتر روش كارتر از محاسن مهم آن نسبت به روش هاي هم ارز بود. در اين روش آنتي ژن هاي كپسولي اختصاصي استخراج و در معرض اريتروسيت هاي گروه خوني O انسان در كنار آنتي سرم هاي مختلف قرار مي گرفت. در اين روش تعدادي از سويه هاي پاستورلا مولتوسيدا يافت مي شد كه روش كارتر قادر به تعيين تيپ آن ها نبود. مطابق روش كارتر تيپ A و B بيشتر در گاو ديده مي شد. تيپ A با پنوموني گاوي و تيپ Bبا سپتي سمي هموراژيك ارتباط تنگاتنگي داشت. تيپ Aهمچنين موجب وباي طيور در ميان ماكيان مي گشت. تيپ D نيز عمدتا از خوك به همراه تيپ A جدا مي گشت. در سال ۱۹٦۳ كارتر تيپ جديدي از پاستورلا مولتوسيدا را جدا نمود كه تيپ E ناميده مي شد. اين تيپ با بيماري سپتي سمي هموراژيك در قاره آفريقا در ارتباط بوده و خارج از اين قاره گزارش نشده است(۹.(

در سال ۱۹٦۱ ناميوكا و موراتا بر اساس آنتي ژن پيكري توانستند پاستورلا مولتوسيدا را در ۱٦ دسته سرمي قرار دهند (۱۱). حدود يازده سال بعد يعني در سال ۱۹۷۲، Heddlestonو همكاران روش ديگري را بر پايه آنتي ژن پيكري طراحي كردند (۱۲). اين روش كه با روش ناميوكا و موراتا هم خواني نداشت نيز پاستورلا مولتوسيدا را در ۱٦ گروه سرمي جاي داد و به خاطر سادگي انجام آن نسبت به روش ناميوكا و موراتا كم كم جاي آن را گرفت. اين روش كه بر پايه روش رسوبي انتشار ژل استوار بود در كنار تست هاي بيوشيميايي روش بسيار مناسبي براي طبقه بندي پاستورلا معرفي گرديد. نتايج روش هاي مذكور هم ارز با روش كارتر نشان داد كه تنها سروتيپ هاي محدودي در داخل هر يك از تيپ هاي

كپسولي پيشنهاد Carter، توان بيماري زايي در ميزبان هاي خاصي را دارند و بدين ترتيب سيستم هاي آميخته از تيپ هاي كپسولي و پيكري براي تعيين تيپ پاستورلا ها بكار گرفته شد (۹). علي رغم پيشرفت هاي شاياني كه در طبقه بندي سرولوژيك باكتري مذكور به عمل آمده بود اما تنوع بيوشيميايي اين باكتري به خصوص در تخمير كربوهيدرات ها خود را بيش از پيش نمود داد. به طوري كه در زمره تغييراتي كه توسط موتر و همكاران بر اساس همولوگي DNA – DNAدر خصوص طبقه بندي جنس پاستورلا انجام گرفت اين امر نيز آشكار گرديد كه بر اساس تخمير قند دلسيتول و سوربيتول مي‌توان پاستورلا مولتوسيدا را در گروه هاي مختلفي قرار داد. بر همين اساس پاستورلا مولتوسيداها به بيوتيپ هاي پاستورلا مولتوسيدا بيوتيپ مولتوسيدا، پاستورلا مولتوسيدا بيوتيپ گاليسيدا و پاستورلا مولتوسيدا بيوتيپ سپتيكا تقسيم شدند. پاستورلا مولتوسيدا بيوتيپ گاليسيدا هر دو قند را تخمير، پاستورلا مولتوسيدا بيوتيپ مولتوسيدا تنها قند سوربيتول را تخمير و پاستورلا مولتوسيدا بيوتيپ سپتيكا هيچ كدام از قندها را تخمير نمي كرد. اخيرا تحت گونه جديدي تحت عنوان تايگريس نيز از كودكي كه توسط پلنگ گاز گرفته شده بود جدا گرديده است (۱۳). برخي از منابع براي پاستورلا مولتوسيدا تحت گونه مولتوسيدا دو واريانت A و B پيشنهاد كرده‌اند.

در سال ۱۹۹۵، بلاكال و همكاران توانستند بر اساس توانائي تخمير قندهاي- Lآرابينوز، دلسيتول، -Dگلوكز، -Dلاكتوز، مالتوز، -Dمانيتول، -Dسوربيتول، -Dسوكروز، -Dترهالوز و-D زايلوز و نيز انجام تست هاي اورني تين و دكربوكسيلاز (ODC)و نيز تست بتا گالاكتوزيداز ترانسفراز پاستورلاها را در ۱۶ بيوتيپ تقسيم نمايند. اين روش تاكنون در جدايه‌هاي خوكي و طيور انجام گرفته ولي در ساير جدايه‌ها تجربه نشده است. محققين فوق روش خاص براي اين آزمايش ابداع كرده‌اند كه به نام Microplate fermatation method ناميده مي‌شود (۱٤).

اکنون بسیاری از سویه های پاستورلا مولتوسیدا دارای یک کپسول پلی ساکاریدی در سطح خارجی هستند که بر اساس تفاوت درآنتی ژن کپسولی به ٥ سروگروپA ، B، D، E، Fو براساس لیپوپلی ساکارید (LPS) به ۱٦ سروتایپ تقسیم می شوند و معمولاً ساکن غشای مخاطی حیوانات وحشی و اهلی اند، ولی جزء فلور طبیعی در انسان نیستند، پاستورلا جزء بیشترین گونه هایی اند که می توانند به عنوان پاتوژن اولیه یا فرصت طلب در میزبان عمل کنند، همچنین مسئول ضرر و زیان قابل توجهی در دام و طیور اند (۳ .(

اپیدمیولوژی

بیماری های ناشی از پاستورلا مولتوسیدا در تمام دنیا و طیف گسترده ای از میزبان ها و در سراسر جهان وجود دارد و تقریبا در تمام گونه های دامی بروز می کند. پاستورلوز گاو و گاومیش که به وبای گاوی نیز موسوم است یکی از عوامل مهم تلفات و خسارات اقتصادی در بسیاری از نقاط جهان است (۱٥). در ایران بیماری پاستورلوز گاو و گاومیش عمدتا در آذربایجان غربی گیلان و خوزستان بروز میکند (۱٦). شناسایی بیماری بر اساس نشانه های خاص، ضایعات پاتولوژیکی عمده، الگوهای شیوع بیماری و مرگ و میر، حساسیت گونه ها و سن گروه های آلوده شده صورت می پذیرد. شناسایی نهایی و جداسازی پاستورلا مالتوسیدا با شناسایی باکتری از موارد مظنون به وجود باکتری به وسیله کشت، شاخصه های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی وابسته است (۱٥.(

مورفولوژی

کلنی تمام گونه ها معمولا بعد از ۲٤ ساعت ظاهر می شوند. اندازه آنها متوسط، گرد و مایل به خاکستری است. پاستورلا دارای ویژگی های بوی شیرین که برخي آن را مربوط به توليد اندول از سوي اين باكتري مي دانند هست. این بو مشابه بوی کلنی های باکتری اشریشیا کولای ولی از آن تندتر و تیزتر است، از ویژگیهای دیگر غیر همولیتیک، عدم رشد روی مک کانگی آگار و تولید اندول می باشد Mannheimia haemolytica .همولیتیک هستند و معمولا نمک های صفراوی را تحمل و در مک کانگی آگار به صورت کلونی های کوچک قرمز رشد می کنند. (۷.(

ویژگی های میکروسکوپیک

سلول های کوچک، گرم منفی میله ای یا کوکوباسیل در لکه های رنگ آمیزی گرم همیشه به آسانی از بافت آسیب دیده قابل تشخیص نیست. در شرایط سپتی سمی، از جمله وبای گاوی، پاستورلا مولتوسیدا دو قطبی متمایز مطابق در رنگ آمیزی گیمسا یا لیشمن دیده می شود (شکل ۱-۲.(

در گسترش تهیه شده از کلونی های کوچک مشخص باکتری های میله ای یا کوکوباسیل گرم منفی مشاهده می شود. گونه های پاستورلا و منهمیا غیر متحرک هستند و این را می توان در پایه مرطوب یا محیط کشت حرکت، آن را نشان داد (۷.(

تست های بیوشیمیایی

شناسایی ممکن است به دلیل ویژگی های بیوشیمیایی مشابه در میان گونه هایPasteurella ، Actinobacillus، Biberteinia وAvibacterium به سختی امکان پذیر باشد. مشخصات کلنی های گونه های Pasteurella و Mannheimiaکوچک، میله ای یا کوکوباسیل گرم منفی که اکسیداز مثبت (انتروباکترها اکسیداز منفی هستند) و کاتالاز مثبت (به جزء P.caballi) می باشند. محیط کشت مک کانکی آگار در تفریق پاستورلا مولتوسیدا و منهمیا همولیتیکا از هم نقش اساسي دارد، پاستورلا مولتوسیدا در مک کانکی آگار رشد نمی کند. پاستورلا مولتوسیدا برخلاف باکتري هاي گرم منفي ديگر در تست آنتي بيوگرام نسبت به پني سيلين حساسيت از خود بروز مي دهد. امروزه جهت تاييد تشخيص دو روش استفاده از نمونه‌هاي استاندارد و نيز استفاده از روش هاي فنوتيپي در كنار روش هاي ژنتيكي حائز اهميت فراواني است(۷). پاستورلا مولتوسیدا در محیط SIM بدون حرکت، بدون تولید گاز SH2 و در مقابل معرف کواکس تولید رنگ ارغوانی می کند که نشان دهنده اندول مثبت بودن آن است KIA.یکی از محیط های بررسی توانایی باکتری در تخمیر قند گلوکز و لاکتوز استفاده می شود. اکثر پاستورلا مولتوسیدا ها گلوکز مثبت و لاکتوز منفی هستند. به طور کلی پاستورلا مولتوسیدا ایجاد گاز نمی کند ولی مشخصه اصلی آن در تست های بیوشیمیایی، اکسیداز وکاتالاز مثبت بودن این باکتری است. این باکتری توانایی رشد بر روی محیط MacConky Agar را نداشته و اوره آز منفی می باشد.

بیماری زایی پاستورلا مولتوسیداB2

بیماریهای ناشی از پاستورلا مولتوسیدا در تمام دنیا و تقریبا در تمام گونه های دامی بروز میکند. باکتری فلور طبیعی ناحیه دهانی حلقی پستانداران است. این باکتری عامل ضررهای اقتصادی در صنعت پرورش گاو گوشتی و بره میباشد. بیشتر عفونتها در اثر حمله باکتری به دلیل برخورد با استرس است ولی انتقال از منابع خارجی نیز ممکن است به وسیله ریز قطره ها یا تماس مستقیم اتفاق بیفتد. بدلیل اینکه عمر باکتری در محیط کوتاه ولی در لاشه طولانی تر است لذا انتقال بین دامها اغلب بوسیله ریز قطره ها یا غذا و آب آلوده است. موارد فوق بخصوص در انتقال بیماری اپیدمیهای وبای خوکها و سپتی سمی هموراژیک در گاو و گاومیش در مناطق حاره اهمیت دارد. کنه و کک به عنوان ناقلین طبیعی نیز شناخته شده اند. برخلاف پستانداران باکتری مذکور فلور طبیعی پرندگان نمی باشد و حضور آن نشانه بیماری حاد یا مزمن است. موارد اپیدمی بیماری سپتی سمی هموراژیک با تلفات زیاد همراه میباشد. تک گیری بیماری در آهو در جنوب آفریقا گزارش شده است.

استرس و عفونتهای ویروسی در بیماری سپتی سمی هموراژیک گاو و گوسفند از اهمیت کمتری برخوردار است. زیرا گونه های درگیر در این بیماریها شدیدا مهاجم هستند و باکتری به طور اولیه بیماریزا می باشد. بیشتر موارد شیوع تنفسی در گاو و خوک به علت تهاجم باکتری از منبع داخلی ناحیه دهانی حلقی است. استرسهای مختلف از قبیل حمل و نقل عفونتهای ویروسی هوای بد تغذیه بد و تجمع زیاد دام منجر به رشد و تکثیر باکتری در مخاط دهانی حلقی میشود و متعاقب آن باکتری به قسمتهای پایینی دستگاه تنفس نفوذ میکند. عفونتهای اولیه ویروسی و مایکوپلاسمایی عامل مستقر کننده ای در جهت ابتلا به تهاجم ثانویه پاستورلا مولتوسیدا میباشند و علت آن اختلال در اعمال ماکروفاژهای الوئولی و آسیب مکانیسم

تصفیه مژه ای مخاطی در نای و نایژهها می باشد. و بالاخره آماس موضعی منجر به آبکی شدن مخاط و متعاقب آن بروز عطسه و سرفه میشود. در هنگام دم باکتری از قسمتهای بالائی دستگاه تنفسی بطرف قسمتهای پایینی حرکت میکند بدین ترتیب شرایط احتمالی مساعد کننده در وقوع پنومونی پاستورلائی اتفاق می افتد .

پاستورلوز در گاو و گاومیش ممکن است به سه شکل بروز کند: یک شکل عفونت عمومی همراه با خونریزی که به نام سپتی سمی همراژیک خوانده میشود. دیگری شکل ورمی است که باربون نامیده میشود و اغلب در گاو و گاومیش بروز مینماید و این دو شکل با تلفات سنگین همراه میباشد. شکل سوم پاستورلوز گاو پاستورلوز ریوی است که بوسیله برونکوپنومونی مشخص میشود. سیر این بیماری طولانی تر و تلفات آن کمتر است.

بیماری سپتی سمی هموراژیک در مناطق حاره ای و تحت حاره ای آسیا و آفریقا باعث ضررهای اقتصادی زیادی میشود. عامل بیماری در افریقا پاستورلا مولتوسیدا تیپ کپسولی B و E که دارای آنتی ژن پیکره O6 است. اگر چه این تیپها در ناحیه دهانی حلقی حاملین سالم یافت میشوند ولی حضور آنها هرگز طبیعی نیست. انتقال بیماری احتمالا از طریق ریزقطره هاست ولی مانند دیگر بیماری ناشی از پاستورلا عوامل محیطی در پیدایش بیماری اهمیت زیادی دارند. در آسیا سروتیپ B2مسول بیماری شناخته شده است. بروز اپیدمی فصلی میباشد و به تغییرات شدید فصلی مربوط است و بیماری در فصل بارانی اتفاق می افتد. شیوع بیماری با مرگ یک یا دو دام همراه است که در طول بیماری تعداد زیادی باکتری دفع خواهد شد. این باکتری بطور مستقیم یا غیر مستقیم توسط دام های مجاور آلوده منتقل میگردد و سرعت اپیدمی در دامهای مستقر اتفاق می افتد. میزان تلفات بالاست و در دامهای حامل باکتری در لوزه ها و مخاط حلق یافت میشود. اگر چه عامل حدت باکتری ناشناخته شده است ولی نشان داده شده است که تیپ B شدیدا حدت دارد تولید هیالورونیداز میکند. این آنزیم در باکتری های گرم مثبت با حدت ارتباط دارد .

تشخیص مولکولی

بسیاری از روش های تشخیصی مولکولی حال حاضر برای شناسایی نمونه های پاستورلا از جمله ١٦ S rRNAو روش های مختلف PCR در دسترس می باشد. ژن Kmt1 اختصاصی جنس و گونه پاستورلا مولتوسیدا می باشد که به کمک آزمون PCR قابل ارزیابی می باشد .

فاکتورهای حدت

کپسول، لیپوپلی ساکارید، پروتئین های غشای خارجی، فاکتورهای جذب آهن، توکسین، فیمبریه و ادهسین، آنزیم هایی مانند نورآمینیداز و هیالورونیداز از مهم ترین عواملی هستند که باعث می شود پاستورلا مولتوسیدا بیماری زا باشد که اینها عوامل بیماری زا (VFs) یا Virulence Factors نامیده می شود.

کپسول

کپسول پلی ساکاریدی پاستورلا مولتوسیدا حفاظتی بر علیه سیستم ایمنی میزبان از طریق کاهش جذب ماکروفاژ و کاهش حساسیت پذیری به فعالیت باکتریوسیدال کمپلمان ایجاد می کند. ترکیبات کپسولی می تواند از یک سروتیپ به سروتیپ دیگر متفاوت باشد (٧). کپسول پاستورلا مولتوسیدا را مي‌توان بر اساس روش هاي سرولوژي در ٥ گروه A ، B، D، Eو F تقسیم نمود .

تعیین تیپ کپسولی پاستورلا مولتوسیدا

پنج تیپ یا سروگروپ از پاستورلا مولتوسیدا A، B، D، Eو F معین شده است که بر اساس تفاوت در جنس های کپسول شان (پلی ساکاریدها) شناسایی شده اند. روش مولکولی مبتنی بر PCR نیز برای تعیین تیپ کپسولی معرفی شده است. اساس این روش استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر تیپ کپسولی که قطعه اختصاصی از ژن کپسولی را تکثیر می دهد استوار است. این روش مولکولی بسیار سریع و آسان و دقیق است.

پروتئین های غشاء خارجی

OmpHاز پروتئین های غشا خارجی پاستورلا مولتوسیدا می باشد. وزن مولکولی OmpH34 تا ٤٢ کیلودالتون متغیر است که به عنوان کاندیدای واکسن مورد استفاده قرار می گیرد .

فیمبریه و ادهسین ها

چسبندگی باکتری ها به سلول میزبان، یک گام حیاتی در کلونیزاسیون و پاتوژنز بیماری است که توسط ادهسین ها انجام می شود. ادهسین ها یک عنصر کلیدی در تثبیت باکتری ها بر روی سطح سلول اپی تلیال میزبان است و در سروگروپ های A، BوD دیده می شود. ژن fimA در این باکتری یک ادهسین است .

۲. باسیلوس و کلستریدیوم

شش باکتری گرم مثبت و مهم داریم : ۲ تا کوکسی ، ٤ تا استوانه ای (باسیلوسی) . ۲ تا از استوانه ای ها اسپورسازاند و ۲ تای دیگر قادر به ساختن آن نیستند .

باسیلوس و کلستریدیوم با رهایش اگزوتوکسین های قوی ، ایجاد بیماری می کنند آنها از لحاظ بیوشیمیایی در اکسیژن دوست بودن یا نبودن با هم فرق دارند . باسیلوس از اکسیژن لذت می برد (هوازی) ، اما کلستریدیوم در محیط بی هوازی رشد و تکثیر می کنند،

دوگونه پاتوژن گرم مثبت ، هوازی ، استوانه ای و اسپورساز وجود دارد : باسیلوس آنتراسیس ،باسیلوس سرئوس . باسیلوس آنتراسیس بیماری آنتراکس و باسیلوس سرئوس ، گاسترواننتریت (مسمومیت غذایی) ایجاد می کند.

باسیلوس آنتراسیس

باسیلوس آنتراسیس از این لحاظ که تنها باکتری کپسول دار از جنس پروتئین (پلی - D گلوتامیک اسید) است ، منحصر به حساب می آید . این کپسول از فاگوستیوز جلوگیری می کند . باسیلوس آنتراسیس باعث ایجاد آنتراکس ، بیماری ای که عمدتا گیاه خواران (گاو وگوسفند) را مبتلا می کند ، می شود.

انسان ها در طی تماس مستقیم با حیوانات یا خاک آلوده یا حین حمل محصولات حیوانی آلوده مثل چرم و پشم در معرض اسپور باسیلوس آنتراسیس قرار می گیرند . در ایالات متحده ، موارد بیماری بعد از تماس با محصولات مویی بز جزیره هائیتی از جمله چلیک و قالیچه ایجاد می شود . انتقال فرد به فرد هرگز گزارش نشده است.

باسیلوس آنتراسیس اسپور می سازد که مقاوم به خشکی ، گرما ، نور ماوراء بنفش و حشره کش ها است و می تواند برای مدت ها در خاک به حالت کمون بمانند . هنگامی که به زخم پوست ، روده و ریه می رسد ، شروع به رشد کرده و توکسین ایجاد می کند . تکثیر و بیان پلاسمید که ویرولانس فاکتورها (بر روی پلاسمیدها (POX1 , POX2 را رمز گشایی می کند با افزایش دما به ، تغلیظ کربن دی اکسید و پروتئین های سرم تنظیم می شود .بنابراین اسپور تنها زمانی فعال می شود که به بدن میزبان راه یابد . بعلت اندازه ی کوچک (۱-۲ μmکه برای استنشاق به درون الوئول ها ایده آل است) ، پایداری و کشندگی حتمی ناشی از آنتراکس ریوی (بعد از استنشاق اسپور) این میکروارگانیسم یک عامل ایده آل برای استفاده در سلاح های کشتار جمعی و جنگ ها مطرح می شود که بوسیله کشور ژاپن در سال ۱۹٦۰ در جنگ منچوری Manchuria استفاده شد.

در عفونت آنتراکس پوستی (که شایع ترین راه ورود میکروارگانیسم است) باسیلوس آنتراسیس به سرعت تقسیم شده و یک اگزوتوکسین بسیار قوی ترشح می کند . این اگزوتوکسین نکروز بافتی موضعی ایجاد می کند که بصورت یک زخم سیاه گرد و خطرناک با حاشیه ی ادم دار مشخص می گردد . به این زخم پوستول بدخیم می گویند زیرا در صورت عدم درمان آنتی بیوتیکی باسیلوس آنتراسیس می تواند به درون جریان خون منتشر شده و موجب مرگ گردد . زخم پوستی معمولا در

۹۰ – ۸۰ % موارد به صورت خود به خودی بهبودی می یابد اما گاهی ادم حاد پوست و شوک ایجاد می شود . آنتراکس ریوی که بیماری چشم ریسان (woolsortir's disease) نامیده می شود در واقع پنومونی نیست . اسپورها توسط ماکروفازها در ریه بلعیده شده و به عقده های لنفاوی مدیاستینال و نافی منتقل می گردند و در آنجا تکثیر می یابند . حال در نتیجه بزرگ شدن غدد مدیاستینال (که به صورت ناحیه ی بزرگ شده در اطراف و بالای قلب در رادیوگرافی قفسه سینه و CT اسکن مشاهده می شود) و افیوژن پلورال، خونریزی مدیاستینوم رخ می دهد.

آنتراکس گوارشی نادر است و غالبا منجر به مرگ می شود . بروز این نوع از آنتراکس بعلت بلع اسپور می باشد (گاهی ناشی از گوشت آلوده) . باسیل آنتراسیس در روده رشد و تکثیر یافته و اگزوتوکسین خود را ترشح می کند . این گروه باعث ایجاد یک زخم نکروتیک در روده می گردد و در این حال بیماران با علائمی مانند استفراغ، دردهای شکمی و اسهال خونی مراجعه می نمایند.

ترشح اگزوتوکسین علت اصلی میزان مرگ و میر بالای آنتراکس است . این اگزوتوکسین ها روی پلاسمیدی به نام PXO1 کد می شوند و حاوی ۳ پروتئین مجزا است که به تنهایی سمی نیستند اما زمانی که با هم باشند باعث اثرات سیستمیک آنتراکس می گردند:

.1فاکتور ادم : (EF) ابن فاکتور ساب یونیت A فعال اگزوتوکسین می باشد این فاکتور یک آدنیکات سیکلاز وابسته به کالمودولین است و موجب افزایش CAMP شده که خود سبب ضعف فعالیت نوتروفیل ها و ایجاد یک ادم وسیع می گردد (موجب مختل شدن هومئوستاز آب می گردد(

.2آنتی ژن محافظت کننده : (PA) ورود EF را به داخل سلول های فاگوستیک تسهیل می نماید (نظیر ساب یونیت Bسایر A-B توکسین ، بررسی اگزوتوکسین ها در بخش ۲ رابببنید(

.3فاکتور کشنده : (LF) یک متاتولوپروتئیناز روی (Zn) می باشد و پروتئین کیناز را غیر فعال می نماید . این فاکتور (توکسین) ماکروفازها را تحریک کرده و موجب رها سازی TNF و ۳ و IL-1 از آن می گردد و در مرگ ناشی از آنتراکس همکاری می کنند.

دومین پلاسمیدPXO2 ، 3ژن ضروری برای سنتز کپسول پلی گلوتامیل را کد می کند . این کپسول از فاگوسیتوز باکتری فعال (رشد کننده) ممانعت بعمل می آورد. هر دو پلاسمید برای ویرولانس باکتری ضروری می باشند.

تشخیص سریع و استفاده ی بی درنگ از پنی سیلین ، داکسی سیلین ، سیپروفلوکساسین یا لووفلوکساسین برای پیشگیری از مرگ و میر بالایی که بوسیله عفونت سیستمیک با باسیلوس آنتراسیس بوجود می آید ضروری هستند.

افرادی که فعالیت های پرخطر دارند(نظیر افرادی که پشم بز یا گاوها را کشورهایی که در آن بیماری شایع است می چینند) و سربازان باید توسط واکسن حاوی آنتی ژن محافظت کننده (PA) واکسینه شوند.

حیوانات را بوسیله میکروارگانیسم زنده ی ضعیف شده که پروتئین های کپسولار ضد فاگوسیتی خود را از دست داده اند واکسینه می کنند البته این واکسن زنده ضعیف شده برای مصارف انسانی بسیار خطرناک می باشند.

باسیلوس سرئوس

باسیلوس سرئوس از حیث داشتن قابلیت حرکت ، نداشتن کپسول و نیز مقاومت به پنی سیلین با باسیلوس آنتراسیس متفاوت است . این میکروارگانیسم موجب مسمومیت غذایی می گردد (حالت تهوع ، استفراغ و اسهال) . مسمومیت غذایی زمانی رخ می دهد که باسیلوس سرئوس اسپورهای خود را در غذا به جای می گذارند. این اسپورها از مراحل اولیه پختن غذا جان سالم به در می برند ، سپس رشد و تکثیر یافته و اگزوتوکسین خود را درون غذا ترشح می کند . برای غیر فعال ساختن اسپور می بایست غذای پخته شده را در دماهای بالا و یا در یخچال نگه داری شود.

باسیلوس سرئوس می تواند ۲ نوع انتروتوکسین ترشح نماید که انواع مختلفی از مسمومیت غذایی را ایجاد می کنند:

.1توکسین حساس / ناپایدار به گرما که مشابه انتروتوکسین وبا و توکسین LT اشرشیاکولی باعث تهوع ، دردهای شکمی و اسهال می شود ، پس از ٢٤ – ١٢ ساعت بهبود می یابد.

.2توکسین مقاوم به حرارت که سندرم بالینی مشابه با مسمومیت غذایی با استافیلوکوکس اورئوس ایجاد می کند . دارای دوره ی کمون کوتاهی است و بدنبال آن حالت تهوع و استفراغ شدید و اسهال محدود شونده ایجاد می گردد.

کلستریدیوم ها

کلستریدیوم ها نیز باسیل های گرم مثبت اسپورساز می باشند . اما بی هوازی هستند ، بنابراین می توان با استفاده از محیط کشت های بی هوازی آن ها را از سایر باسیل های اسپورساز هوازی (نظیر باسیلوس ها) افتراق داد . این باکتری مسئول ایجاد بیماری های معروفی نظیر : بوتولیسم ، تتانوس ، گانگون گازی و کولیت غشاء کاذب می باشد.

کلستریدیوم بوتولونیوم

این باکتری نوروتوکسین فوق العاده خطرناک می سازد که به سرعت موجب مسمومیت غذایی کشنده می گردد . این نوروتوکسین رهایش استیل را از پایانه های عصبی پیش سیناپسی در صفحه ی محرکه انتهایی و سیستم عصبی بلاک کرده و موجب فلج عضلانی شل کننده می گردد.

بوتولیسم بزرگسالان

خوردن ماهی دودی یا سبزیجات کنسرو شده ی خانگی با انتقال بوتولیسم مرتبط است. اسپورهای کلستریدیوم بوتولونیوم در هوا معلق و در حال پرواز بوده و می تواند روی غذا بنشیند . اگر غذا کاملا پخته شود اسپورها می میرند اما اگر غذایی که حاوی اسپورهاست به طور کامل و به اندازه پخته نشود و سپس در یک محیط بی هوازی (نظیر ظرف شیشیه ای یا کیسه های فریز زیپ دار) قرار بگیرد ، کلستریدیوم بوتولونیوم در آن رشد کرده و نوروتوکسین خود را سنتز می نماید . افرادی که این غذا را هفته ها بعد باز کرده و مصرف کنند این نورو توکسین قوی را به همراه غذا به درون سیستم گوارش می بلعند .این بیماران تب ندارند و در ابتدا دچار فلج عصب کرانیال دو طرفه می گردند که موجب دوبینی و دیسفاژی می گردد و پس از این علائم ضعف عضلانی عمومی اتفاق می افتد که به سرعت موجب فلج ناگهانی عضلات تنفسی و مرگ می شود . بیماران بلافاصله باید بلافاصله تحت درمان با آنتی بیوتیک قرار گیرند ولی تنها می تواند نورو توکسین های آزاد موجود در جریان خون را خنثی سازد . انتوباسیون در مجرای تنفسی و حمایت های تنفسی (مثلا با ونتیلاتور) تا زمانی که وی توانایی عضلانی خود را بدست آورد ضروری است.

بوتولیسم نوزادی

بوتولیسم نوزادی زمانی رخ می دهد که نوزاد ماده ی غذایی آلوده به اسپور کلستریدیوم بوتولونیوم را به دنبال خوردن عسل تازه که به اسپور آلوده است مصرف کند. اسپوررشد و تکثیر نموده و کلستریدیوم بوتولونیوم درون روده ه ی نوزاد کلونیزه شده سپس از این مکان توکسین بوتولیسم رها می شود.

در ابتدا نوزاد به مدت ۲ تا ۳ روز دچار یبوست می گردد و بدنبال آن سختی بلع و ضعف عضلانی رخ می دهد . این نوزادان که بدنشان سست گشته می بایست بستری شوند و تحت درمان های حمایتی قرار گیرند . پیش آگهی آن عالی است بنابراین معمولا آنتی توکسین استفاده نمی گردد.

کلستریدیوم تتانی

کلستریدیوم تتانی باعث بیماری تتانوس می شود که به طور کلاسیک بعد از خراش و زخم پوستی با یک میخ زنگ زده ایجاد می گردد . اما بر اثر ترومای پوستی با هر شیئی که آلوده به اسپور باشد نیز می تواند ایجاد شود . اسپورهای کلستریدیوم تتانی که معمولا در خاک و مدفوع حیوانات یافت می گردند در زخم / خراش باقی می مانند و تا زمانی که محیط بی هوازی فراهم باشد قادر به رشد و تکثیر می باشند (بافت نکروره). در این محل کلستریدیوم تتانی اگزوتوکسین خود به نام تتانواسپاسمین را رها می کند.

توکسین تتانوس نهایتا سبب انقباض عضلات اسکلتی می گردد که به آن تتانی اطلاق می شود.

به علت مرگ و میر بالای ناشی از تتانوس ، ایمنی سازی پروفیلاکتیک توسط توکسین غیر فعال شده با فرمالین (توکسو ئید تتانوس) هر ۱۰ سال یک بار در ایالات متحده انجام می گیرد . این تقویت سبب تولید بیشتر آنتی بادی های در گردش علیه توکسین تتانوس می گردد که اولین با ایمن سازی دوران کودکی بوجود آمده اند . ممکن است اولین باری را که واکسینه شدید را به یاد نیاورید (احتمالا در آن زمان ۲ ماهه بوده اید) ، اما در ایالات متحده تمام کودکان بوسیله ی نوبت هایی از واکسن) DPT دیفتری ، سیاه سرفه ، کزاز) در سنین ۲ ، ٤ ، ٦ و ۱۸ ماهگی و قبل از ورود به دبستان (٦ – ٤ سالگی) واکسینه می گردند . این سیاست موجب حفاظت در برابر تتانوس (در کنار دیفتری و سیاه سرفه) می گردد. با این حال

ایمن سازی در برابر کزاز تتانوس تنها ۱۰ سال دوام می آورد بنابراین تزریق های تقویت کننده ی واکسن کزاز هر ۱۰ سال اعمال می شوند.

کلستریدیوم پرفرنجنز

مطمئنا همه راجع به قانقاریا مطالبی شنیده اید. قبل از حضور آنتی بیوتیک ها کلستریدیوم پرفرنجنز زخم های سربازان را در جنگ ها آلوده می کرد. این باکتری که اسپورهایش در خاک یافت می شود در محیط بی هوازی رشد و تکثیر یافته و گاز تولید می کند. اسپورآنها قادرند زخم های حاصل از جنگ یا سایر تروماها را آلوده سازند . زخم های عمیق با بافت های مرده ی فراوان فضایی بی هوازی بوجود می آورد که مکانی عالی برای رشد کلستریدیوم پرفرنجنز است. در ضمن رشد این میکرواورگانیسم بی هوازی ذخایر آنزیم اگزوتوکسین نیز رها شده و موجب تخریب بیشتر بافتی می گردد (شکل۲-۸ را ببینید.(

از نظر بالینی ۲ نوع عفونت توسط کلستریدیوم پرفرنجنز ایجاد می گردد:

.1سلولیت / عفونت زخم : پوست نکروزه در معرض کلستریدیوم پرفرنجنز قرار می گیرد و سپس کلستریدیوم رشد کرده و بافت های موضعی را تخریب می کند. در لمس با دست ضایعه حالت مرطوب ، متخلخل و اسفنجی همراه با صدای ترق و تروق دارد که به علت فضاهای حاوی هوا بوجود می آید و کریپتوس۱ نام دارد.

.2میونکروز کلاستریدیایی : کلستریدیوم پرفرنجنز همراه تروما به داخل ماهیچه تلقیح می گردد و با ترشح اگزوتوکسین ماهیچه های مجاور را نیز تخریب می کند . این باکتری بی هوازی آنزیم های دیگری را نیز رها می سازد که با تخمیر کربوهیدرات تولید گاز خواهد کرد . CTscanمی تواند حبابچه های هوا را درون عضلات و بافت زیر پوستی نشان دهد . زمانی که آنزیم ها عضلات را تحلیل می برند یک مایع سیاه رقیق از پوست تراوش می گردد.

1.Crepitus

اگر میونکروز کلاستریدیایی سریع شناسایی و در مان نشود ، مرگ آور است . اکسیژن فشار بالا، آنتی بیوتیک ها (مانند پنی سیلین) و خارج نمودن بافت نکروزه می تواند جان بیمار را نجات دهد.

کلاستریدیوم دیفیسیل

ممکن است هیچ گاه نمونه هایی از آنتراکس ، تتانوس یا بوتولیسم را در کار حرفه ای خود مشاهده نکنید اما حتما نمونه هایی از کلاستریدیوم دیفیسیل را خواهید دید و مطمئنا با این میکرواورگانیسم مواجه خواهید شد . کلاستریدیوم دیفیسیل پاتوژن عامل کولیت غشاء کاذب (اسهال) مرتبط با مصرف آنتی بیوتیک است که می تواند بدنبال مصرف آنتی بیوتیک های وسیع الطیف (نظیر آمپی سیلین ، کلیندامایسین و سفالوسپورین ها) ایجاد گردد . این آنتی بیوتیک ها می توانند بخشی از

فلورنرمال روده را از بین برده و در عوض به کلاستریدیوم دیفیسیل پاتوژن اجازه ی تکثیر دهند که گاهی بشدت کولون را آلوده و عفونی می سازد . هنگامی که کلاستریدیوم دیفیسیل به فراوانی تکثیر یافت نوبت به رهاسازی اگزوتوکسین می رسد . توکسین A این میکرواورگانیسم سبب اسهال شده و توکسین B برای سلولهای کلون سیتوتوکسیک می باشد . بیماری با اسهال شدید ، دردهای شکمی (و گرفتگی عضلات شکم) و تب شناسایی می گردد . بعلت حضور کلاستریدیوم دیفیسیل (difficileخیلی سخت (difficult) می شود که به بیمار آنتی بیوتیک داد!!

انجام آزمایشات بوسیله ی کولونوسکوپی موکوس قرمز ملتهب و نواحی با اگزودای سفید به نام غشاء کاذب را بر روی سطح روده ی بزرگ نشان می دهد . نکروز سطح موکوس در زیر غشاء کاذب رخ خواهد داد . زمانی که بیماری در زمان مصرف آنتی بیوتیک دچار اسهال می گردد (یا حدود یک ماه بعد از شروع مصرف آنتی بیوتیک) می بایست کلاستریدیوم دیفیسیل را به عنوان علت محتمل در نظر بگیریم. نمونه های مدفوع می تواند برای تست این میکرواورگانیسم به آزمایشگاه فرستاده شود . حضور توکسین در مدفوع تشخیص را قطعی می کند . درمان شامل قطع آنتی بیوتیک های اولیه و تجویز مترونیدازول و وانکومایسین برای حدود یک ماه می باشد . هر دو این آنتی بیوتیک ها کلاستریدیوم دیفیسیل را کشته اما از روده جذب و وارد جریان خون نمی شوند . بنابراین مترونیدازول در مسیر دستگاه گوارش پایین می روند و به جای اینکه جذب شوند، کلاستریدیوم دیفیسیل بیچاره را زیر می گیرند