نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۲، شماره ۲، سال ۱۳۸۹، ص. ۱۸۹-۱۸۴

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 2, No. 2, 2010, p. 184-189

کاربرد تکنیک Triplex PCR در شناسایی تیپ‌های B، C و D *کلستریدیوم پرفرینجنس*

محمد رضا احسنی[۱] - محمد رضا محمد آبادی[۲*] - مهرداد شمس الدینی بافتی[۳] - مجید عزتخواه[۴]
مهدی حسنی درخشان[۵]- علی اسمعیلی زاده کشکوئیه[۶]

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱
تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۶

چکیده

در این مطالعه ۱۳۰ نمونه مدفوع از گوسفندان نژاد کرمانی اطراف کرمان بطور تصادفی گرفته شد. پس از فرآوری و کشت نمونه‌ها، کلونی‌های حاصل از نظر مورفولوژی و رنگ آمیزی بررسی شدند و با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، گونه‌های آنها شناسایی شد. کلستریدیوم‌های جدا شده ۳۰ درصد نمونه‌ها را شامل می‌شدند که عبارت بودند از *کلستریدیوم‌های پرفرینجنس*، *باراتی*، *ابسونیوم*، *بیفرمنتانس*، *اسپورجنس*، *لپتوم*، *اورانتی‌بوتریکوم*، *اسپوراسفیریدس*، *سیمبی‌زوم*، *اسکاتولوجنس*، *راموزوم* و *سردلی*. عمل استخراج DNA بر روی ۳۹ باکتری جدا شده انجام گردید و جهت تعیین تیپ باکتری‌ها، DNAهای استخراج شده با Triplex PCR آزمون شدند. در آخر نوع توکسین و در نتیجه تیپ‌های این باکتری بر اساس طول قطعه سنتز شده در PCR، شناسایی گردید که از ۲۳ نمونه *کلستریدیوم پرفرینجنس* که با آزمون‌های بیوشیمیایی جدا شده بودند، همگی قطعه 324bp را ایجاد کردند. از این تعداد ۵ مورد تیپ B، ۸ مورد تیپ C و ۶ مورد تیپ D تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: *کلستریدیوم پرفرینجنس*، آزمایش‌های بیوشیمیایی، DNA، Triplex PCR

مقدمه

کلستریدیوم پرفرینجنس یک باکتری بی‌هوازی، گرم مثبت و اسپورزا است که باعث ایجاد بیماری در انسان و دام می‌شود (۸ و۱۰). سویه‌های این باکتری حداقل ۱۵ توکسین تولید می‌کنند که تمام آنها از جنس پروتئین می‌باشند و خاصیت پادگنی دارند (۹). چهار گروه اصلی توکسین *کلستریدیوم پرفرینجنس* شامل آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا می‌باشد که اساس طبقه‌بندی این باکتری به صورت پنج تیپ مختلف A تا E است (۱۹). تیپ‌های مختلف این باکتری عامل بیماری‌های مختلفی است و حتی ممکن است یک سویه بیماری‌های متفاوتی را در میزبان‌های مختلف ایجاد کند (۱۷ و ۱۸).

در بعضی آزمایشگاه‌ها جهت تعیین و تشخیص توکسین باکتری، از آزمایش خنثی سازی سرم در موش و خوکچه هندی استفاده می‌شود (۷). روش جستجوی توکسین در محتویات روده به این صورت است که ابتدا نمونه را در مجاورت محلول کلروفرم قرار داده تا خاصیت پادگنی توکسین حفظ شود، سپس نمونه صاف شده را به حیوانات آزمایشگاهی تزریق می‌کنند. در خوکچه هندی به علت وجود توکسین نکروز دهنده بعد از ۴۸ ساعت در محل تزریق مناطق نکروز مشاهده می‌شود، درحالی‌که موش به علت وجود توکسین کشنده بعد از ۴ تا ۱۲ ساعت تلف می‌شود (۲). این روش شناسایی بسیار مشکل، وقت‌گیر، پر هزینه و تک ظرفیتی است. از طرفی انجام آن روی حیوانات آزمایشگاهی از نظر اخلاقی غیر قابل قبول است (۷ و۱۲). فرزان و همکاران (۱۹۹۶) طی تحقیقی آنتی توکسین اپسیلون در سرم خون گوسفند را با استفاده از روش الایزا اندازه گرفتند و به این نتیجه رسیدند که الایزا روشی اختصاصی، سریع و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است و می‌تواند جایگزین آزمایش خنثی سازی سرم گردد (۱۵). در روش شناسایی الایزا از پادتن‌های پلی‌کلونال برای تشخیص توکسین‌های *کلستریدیوم پرفرینجنس* استفاده می‌شود (۴). مشکل این روش، ایجاد واکنش متقاطع بین پادتن‌های تولید شده علیه توکسین‌ها می‌باشد که می‌تواند در شناسایی نوع توکسین اختلال ایجاد کند. همچنین الایزا قادر به شناسایی توکسین β_2 نیست و برای

۱و۶- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام و استادیار، بخش مهندسی علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- دانشیار هسته تحقیقاتی ژنتیک و حیوانات ترانسژنیک، دانشگاه شهید باهنر کرمان
(* - نویسنده مسئول: Email: mohammadabadi@yahoo.com)
۳، ۴ و ۵- استادیاران موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب شرق کشور - کرمان

تشخیص و تعیین توکسین باید اسپورزایی را بوسیله‌ی روش‌های کشت خاص تحریک کرد (۵). آزمون‌های بیوشیمیایی نیز قادر نیستند تیپ‌های این باکتری را از هم تشخیص دهند (۶).

آخرین فناوری جدیدی که استفاده کاربردی در تشخیص بیماری‌های عفونی دارد، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است (۴). PCR یک تکنیک مولکولی است که در شرایط آزمایشگاهی قادر به تکثیر اسیدهای نوکلئیک است. در هر موجود زنده ترکیب DNA مختص به آن موجود است و تکنیک PCR موجودات را بر اساس DNAهایشان از یکدیگر جدا می‌نماید. با این تکنیک می‌توان باکتری را سریعتر و مستقیماً از نمونه‌های کلینیکی تشخیص داد (۱). در تکنیک Triplex PCR از سه جفت آغازگر متفاوت استفاده می‌شود، در نتیجه به‌طور همزمان تیپ‌های مختلف را می‌توان شناسایی نمود. از اهداف این مطالعه، استفاده از تکنیک Triplex PCR جهت شناسایی تیپ‌های B، C وD *کلستریدیوم پرفرینجنس* بود. لازم به ذکر است که تاکنون تحقیق مستندی در این مورد در ایران وجود ندارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از دامداری‌های ۹ روستای حومه کرمان ۱۳۰ نمونه مدفوع اخذ شد. نمونه‌گیری بصورت تصادفی، از هر دو جنس نر و ماده و در سنین متفاوت انجام شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه تحقیقاتی موسسه رازی شعبه جنوب شرق کشور منتقل و عملیات کشت و جداسازی روی آنها انجام گرفت. نمونه‌ها در آزمایشگاه با سرم فیزیولوژیک نمکی به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق و مخلوط شدند. برای تفکیک باکتری‌های اسپورزا و از بین رفتن باکتری‌های غیر اسپورزا و جوانه‌های رویشی باکتری‌ها، محلول رقیق و صاف شده به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۸۰°C قرار داده شد. سپس یک قطره از سوسپانسون حرارت داده شده روی بلاد آگار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت داده شد. پلیت‌های بلاد آگار کشت داده شده را همراه با اندیکاتور بی‌هوازی درون جار قرار داده و محیط جار توسط دستگاه انوکسومت (مدل Mart) بی‌هوازی و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوباتور قرار داده شد. کلونی‌های ایجاد شده روی بلاد آگار از نظر نوع همولیز ایجاد شده و مورفولوژی بررسی شدند. پس از رنگ آمیزی گرم و آزمون کاتالاز، جهت خالص سازی و رشد تک کلونی‌های مجزا، باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی را مجدداً روی محیط بلاد آگار کشت داده و در شرایط بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار داده شد. تک کلونی‌های رشد کرده پس از بررسی ظاهری و رنگ آمیزی مجدد، همراه با سویه‌های واکسینال به عنوان کنترل مثبت و منفی، با آزمایش‌های بیوشیمیایی ژلاتیناز، لسیتیناز، لیپاز، تجزیه شیر، تولید اندول، تخمیر قندهای گلوکز، لاکتوز، مالتوز و ساکارز و آزمایش حرکت بررسی شدند (۱۱). نتایج حاصل از این آزمایش‌ها، با جداول راهنمای برگی مطابقت داده شد (۶) و گونه‌های کلستریدیوم بر این اساس از یکدیگر تفکیک گردید.

استخراج DNA با روشی که قبلاً توصیف شده (۱۳) روی کلستریدیوم‌های جدا شده و همچنین سویه‌های واکسینال تیپ‌های B، C و D *کلستریدیوم پرفرینجنس* به عنوان کنترل مثبت و *کلستریدیوم‌های سپتیکوم، باراتی* و *راموزوم* به عنوان کنترل منفی انجام شد. به‌طور خلاصه چندین کلونی خالص از باکتری رشد کرده روی محیط بلاد آگار درون میکروتیوب حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و پس از مخلوط شدن، به مدت یک دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و در ۴°C سانتریفوژ شدند تا باکتری رسوب کند. مقدار 350µl از بافر (100mM Tris HCl, 10mM EDTA, 100mM STET NaCl, 5% (v/v) Triton 100X) به میکروتیوب حاوی باکتری افزوده و بعد از آن ۲۵ µl لیزوزوم (10mg/ml) به آن اضافه و ۳ ثانیه ورتکس گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۴۰ ثانیه در بشرآب جوش قرار داده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. برای رسوب اسیدهای نوکلئیک مقدار 40µl استات سدیم ۳ مولار و ۴۲۰µl ایزوپروپانول به محلول اضافه و ورتکس گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. میکروتیوب‌ها با دور ۱۳۰۰۰ و دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و بعد از خارج کردن محلول رویی، رسوب با اتانول ۷۰٪ شسته و خشک شد. رسوب در ۵۰ µl بافر TE حاوی 20mg/ml RNase حل و تا زمان استفاده در برودت ۲۰°C- قرار داده شد (۱۳).

واکنش PCR در میکروتیوب‌های ۰/۵ml با حجم ۵۰ µl انجام شد که حاوی DNA الگو، آغازگرها، dNTPها، Taq پلیمراز، بافر PCR، $MgCl_2$ و آب عاری از نوکلئاز بود. میزان و غلظت واکنشگرها در جدول ۱ آمده است.

آغازگرها مکمل قسمتی از ژن توکسین روی DNA باکتری می باشند. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ آمده است که توسط شرکت سیناژن سنتز شد. این آغازگرها برای اولین با در سال ۱۹۹۷ توسط سانجر و همکاران طراحی و ساخته شد (۱۴). همچنین توسط محققین دیگری از جمله ون آستن و همکاران (۱۶) نیز استفاده گردید.

(جدول ۱)- میزان و غلظت واکنشگرها جهت واکنش Triplex PCR

ترکیب	غلظت	حجم (میکرولیتر)
بافر PCR	۱۰X	۵
کلرید منیزیم	۵۰ میلی مولار	۲
آنزیم Taq polymerase	۵ واحد بر میکرولیتر	۱
مخلوط dNTP	۲/۵ میلی مولار	۱
α-toxin primer R	۱۰ میلی مولار	۱/۲۵
α-toxin primer F	۱۰ میلی مولار	۱/۲۵
β-toxin primer R	۱۰ میلی مولار	۱/۲۵
β-toxin primer F	۱۰ میلی مولار	۱/۲۵
ε-toxin primer F	۱۰ میلی مولار	۱/۲۵
ε-toxin primer R	۱۰ میلی مولار	۱/۲۵
DNA	...	۵
آب	...	۲۸/۵
کل	...	۵۰

(جدول ۲)- اطلاعات در مورد آغازگرها

نوع توکسین	ژن	توالی آغازگر ۳´ - ۵´	جایگاه روی ژن کدکننده توکسین	طول قطعه تکثیر شده
آلفا	plc (cpa)	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	۶۶۳-۹۶۸	۳۲۴ جفت باز
بتا	cpb	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	۸۷۱-۱۰۴۵	۱۹۶ جفت باز
اپسیلون	etx	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	۲۶۷-۸۶۲	۶۵۵ جفت باز

جهت کاهش تبخیر، ۱۰µl روغن معدنی به میکروتیوب‌ها اضافه شد و با پروتکل دمایی موجود در جدول ۳ درون ترموسایکلر (مدل Bio-Rad) قرار داده شدند.

(جدول ۳)- پروتکل دمایی PCR

مرحله	دما (سانتی گراد)	مدت زمان	تعداد سیکل
دناتوره شدن اولیه	۹۵	۱۰ دقیقه	۱
دناتوره شدن	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
چسبیدن	۵۳	۹۰ ثانیه	
سنتز	۷۲	۶۰ ثانیه	
سنتز نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

۱۰ µl از محصولات PCR با ۲µl از 6X Loading dye مخلوط گردید و همراه با ۶µl نشانگر مولکولی استاندارد روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفور، ژل را به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (۱۰ µg/ml) قرار داده تا محصولات PCR تکثیر شده رنگ شود. ژل با احتیاط بر روی صفحه ترانسلومیناتور UV قرار داده شد و عمل عکسبرداری از ژل و ذخیره آن به شکل فایل تصویری انجام گردید. طول قطعات تولید شده با استفاده از برنامه کامپیوتری Onedscan اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از طول قطعات، نوع توکسین و در نتیجه تیپ‌های مختلف این باکتری تشخیص داده شد.

نتایج و بحث

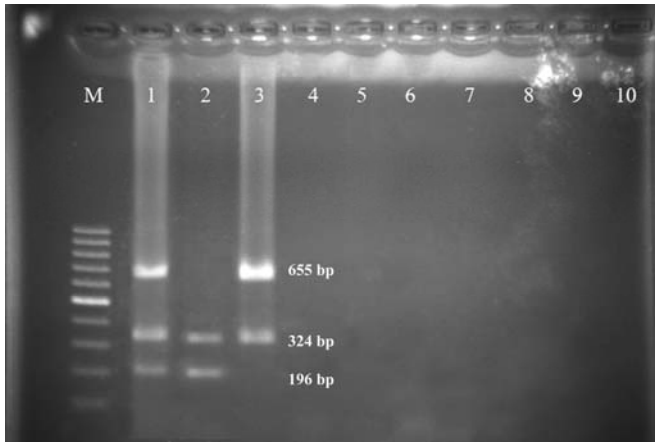
در شکل ۱ سویه‌های واکسینال تیپ B، C و D *کلستریدیوم پرفرینجنس*، که به عنوان کنترل مثبت و سویه‌های *کلستریدیوم‌های سپتیکوم*، *باراتی* و *راموزوم*، که به عنوان کنترل منفی در واکنش PCR استفاده شدند قابل مشاهده است. کیفیت DNAی استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی و تأیید شد. واکنش PCR با سه جفت آغازگر اختصاصی که مکمل قطعه‌ای از ژن‌های کدکننده آلفا، بتا و اپسیلون باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* بودند انجام شد. چسبیدن آغازگر به ژن‌های مکمل خود و سنتز قطعه مورد نظر، نشان‌دهنده وجود ژن توکسین خاص است که تیپ‌های مختلف، براساس نوع توکسینشان شناسایی می‌شوند. همانطوری‌که در شکل ۱ مشاهده می‌شود قطعه 324bp مربوط به ژن توکسین آلفا می‌باشد که در بین همه گونه‌ها مشترک است. قطعه 198bp مربوط به ژن کدکننده توکسین بتا است که در تیپ‌های B و C وجود دارد. قطعه

655bp متعلق به ژن توکسین اپسیلون است که در تیپ D مشاهده می‌شود.

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود از ۲۳ نمونه *کلستریدیوم پرفرینجنس* که با آزمون‌های بیوشیمیایی جدا شده بودند، همگی قطعه 324bp را ایجاد کردند که از این تعداد ۵ مورد تیپ B، ۸ مورد تیپ C و ۶ مورد تیپ D تشخیص داده شد (شکل ۲). در ایران تاکنون تحقیق مستندی در این مورد موجود نمی‌باشد و نتایج این تحقیق با نتایج دیگر محققین (۸، ۱۷ و۱۹) در کشورهای دیگر نیز متفاوت است. این تفاوت بدین خاطر است که وجود و بروز هر تیپ به میزان بسیار زیادی به منطقه جغرافیایی وابسته است و در بعضی مناطق ممکن است بطور کلی یک یا چند تیپ از باکتری وجود نداشته باشد. مثلاً گزارش شده که در آمریکای شمالی تیپ A غالب است و تیپ C و D غیر معمول است (۱۵).

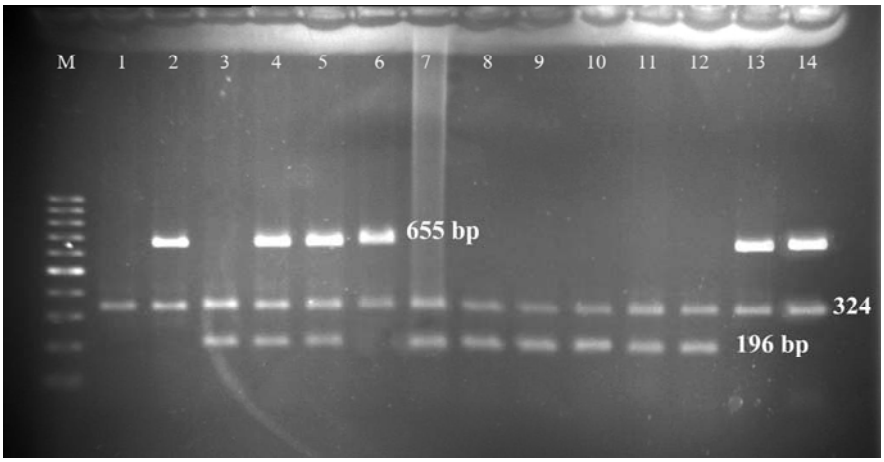
(جدول ٤)- نوع توکسین و تیپ های تشخیص داده شده در این مطالعه

توکسین	تعداد	تیپ
آلفا	۲۳	---
آلفا و بتا	۸	C
آلفا و اپسیلون	۶	D
آلفا، بتا و اپسیلون	۵	B



(شکل ۱)- سویه‌های واکسینال و کنترل های مثبت و منفی

M: نشانگر مولکولی استاندار 100bp، چاهک‌های ۳-۱: کنترل مثبت و سویه‌های واکسینال تیپ‌های B، C و D *کلستریدیوم پرفرینجنس*، چاهک‌های ۶-۴: کنترل منفی، شامل *کلستریدیوم‌های سپتیکوم، باراتی و راموزوم*



(شکل ۲)- تیپ‌های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* جدا شده از نمونه‌ها

M: نشانگر مولکولی استاندار 100bp، چاهک ۱: باند 324bp مشترک بین همه تیپ‌ها، چاهک‌های ۲، ۶، ۱۳ و ۱۴: تیپ D، چاهک‌های ۳ و ۷ تا ۱۲: تیپ C و چاهک‌های ۴ و ۵: تیپ B

از آنجایی که در هر موجود زنده ترکیب DNA واحد و مختص به آن موجود است، تکنیک PCR که موجودات را بر اساس DNAهایشان از یکدیگر جدا نماید تکنیکی بسیار اختصاصی است. آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق کاملاً اختصاصی بودند و فقط مکمل ژن کدکننده توکسین‌های باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* می‌باشد. همانطورکه در شکل ۱ نشان داده شده است این آغازگر سویه‌ی دیگری را شناسایی نمی‌کند. همچنین PCR از حساسیت بالایی برخوردار بود به‌طوری‌که با کمترین میزان DNA (کمتر از ۱µl) و با هر روش استخراج DNA، قادر به شناسایی باکتری بود. همچنین به منظور بررسی حساسیت و ویژگی واکنش PCR، همه سویه‌ها ابتدا با یک جفت آغازگر آزمون شدند (Single PCR) سپس هر سه جفت آغازگر با هم در یک واکنش استفاده شد (Triplex PCR) که نتایج حاصل از هر دو روش یکسان بود.

کلستریدیوم پرفرینجنس عامل بیماری‌های زیادی در انسان و دام است. با توجه به وجود اسپور باکتری در مناطق مختلف و احتمال استفاده از آن در حملات بیولوژیکی و تروریستی، شناسایی این باکتری از اهمیت خاصی برخوردار است. سنجش بیولوژیک یکی از روش‌های مهم در تشخیص *کلستریدیوم پرفرینجنس* است، اما این روش دارای معایب زیادی است. یکی از این معایب طولانی بودن زمان این آزمایش‌هاست، به‌طوری که ۲۴ تا ۷۲ ساعت زمان نیاز است تا بتوان جواب این تست را مشاهده کرد (۲). یکی دیگر از معایب سنجش بیولوژیک، مرگ‌های غیر اختصاصی حیوان آزمایشگاهی است که می‌تواند باعث تشخیص غیر واقعی گردد. پادتن‌های موجود اغلب از نوع پلی‌کلونال بوده که باعث واکنش غیر اختصاصی پادگن-پادتن شده و گاهی نیز تعیین تیپ توکسین را دچار اختلال می‌کند. مواردی که در استفاده از یک تکنیک دارای اهمیت است، دو ویژگی حساسیت و اختصاصی بودن است که تکنیک PCR دارای چنین امتیازی است. در این آزمایش از سه جفت آغازگر به‌طور همزمان استفاده شد که امکان شناسایی همزمان سه تیپ باکتری *کلستریدیوم پرفرینجنس* را فراهم آورده است. از مزایای مهم این روش سرعت بالای آن است به طوری که در کمتر از ۴ ساعت، شناسایی و تعیین تیپ این باکتری امکان پذیر است. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان با تهیه کیت تشخیص سریع *کلستریدیوم پرفرینجنس* نسبت به شناسایی سویه تولید کننده توکسین در نمونه و محیط قبل از تولید سم اقدام نمود. از آنجایی که در PCR از روی تنها یک مولکول DNA مقادیر قابل توجهی از آن تولید می‌شود، PCR ابزار مناسبی برای تشخیص بیماری‌ها می‌باشد. در این موارد، حتی در صورت استفاده از عصاره خام ارگانیسم به عنوان الگوی تکثیر، حساسیت واکنش‌ها بسیار بالا بوده و منجر به نتیجه خواهد شد (۳).

به‌طور کلی روش‌های مولکولی بینش جدیدی در مورد طبقه‌بندی باکتری به ما می‌دهد. یکی از جنبه‌های کاربردی و بسیار مفید PCR این است که می‌توان اطلاعات ژنتیکی مهم در مورد موجود مورد مطالعه به دست آورد. از آنجایی که آغازگرهای PCR به طور اختصاصی عمل می‌کنند، می‌توان در بین گونه‌ها و انواع مختلف جانداران یک گونه یا سویه خاص را ردیابی نمود (۱). علاوه بر نمونه-های کلینیکی، می‌توان نمونه‌های حاصل از منابع مختلف دیگر را نیز در روشی مشابه توسط PCR آنالیز نمود. برای مثال، موجودات بیماری‌زا را می‌توان در حشرات حامل، مدفوع حیوانات، گیاهان و منابع محیطی چون منابع آب و نمونه‌های غذایی تشخیص داد (۳). روش PCR در مقایسه با سایر تکنیک‌های تشخیصی که متکی بر تولید و رشد دادن مقادیر انبوه از سلول یا عامل بیماری‌زا می‌باشند، برای افراد مجری بسیار ایمن‌تر است زیرا اولین مرحله در تهیه نمونه برای انجام PCR، شکستن سلول و آزاد کردن DNA آن است، طبیعی است که در این مرحله سلول از بین رفته و خاصیت بیماری-زایی خود را از دست می‌دهد (۳).

تشکر و قدردانی

این تحقیق با امکانات و تجهیزات موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب شرق کشور-کرمان انجام پذیرفته است لذا از همکاری‌های مسئولین محترم این موسسه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- امتیازی، گ.۱۳۸۶. مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک، ویرایش دوم، انتشارات مانی دانشگاه اصفهان.
۲- حسنی طباطبایی، ع. و ر. فیروزی .۱۳۸۴. بیماری های باکتریایی دام. دانشگاه تهران.
۳- نصیری، م. ۱۳۸۰. اولین کارگاه آموزشی مارکرهای مولکولی DNA در اصلاح و پرورش دام. دانشگاه فردوسی مشهد.
4- Brron, E. J. and S. M. Finegold. 1990. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed. USA. p. 426-7.
5- Baums, C. G., U. Schotte, G. Amtsberg and R. Goethe. 2004. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. Veterinary Microbiology 100: 11-16.

6- Cato, E., W. L. George and S. Finegold. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Genus Clostridium. 2. Michigan State University. 1141-1200.
7- Gokce, H. I., O. Genc, M. Sozmen and G. Gokce. 2007. Determination of *Clostridium perfringens* Toxin-Types in Sheep with Suspected Enterotoxemia in Kars Province, Turkey Turk. J. Vet. Anim. Sci 31(5): 355-360.
8- Gurjar, A. A., N. V. Hegde, B. C. Love and B. M. Jayarao. 2008. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxintyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. Molecular and ellular Probes 22. 90–95.
9- Heikinheimo, A. 2008. Diagnostics and molecular epidemiology of cpe-positive *clostridium perfringens* type A. academic dissertation, University of Helsinki 1-76.
10- Komoriya, T., A. Hashimoto, A. Shinozaki, M. Inoue and H. Kohno. 2007. Study on Partial Purification of α-Toxin Produced from Obligate Anaerobe *Clostridium perfringens*. Report of the Research Institute of Industrial Technology, Nihon University 88: 1-11.
11- MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
12- Piatti, R. M., A. A. Ikuno and L. Baldassi. 2004. Detection of bovine *Clostridium perfringens* by polymerase ahain reaction. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 10(2): 154-160.
13- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2002 Molecular cloning a laboratory manual. 3rd. cold spring harbor laboratory press. 18-96.
14- Songer, J. G. 1996. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals. Clinical microbiology reviews 9: 2. p. 216–234.
15- Timoney, J. F., J. H. Gillespie, F. W. Scott and J. E. Barlough. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and infectious diseases of domestic animals. Eight editions. comstock, comell. 214-240.
16- Van Asten, A. J. A. M., C. W. van der Wiel, G. Nikolaou, D. J. Houwers and A. Grone. 2009. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. Veterinary Microbiology. 136. 411-412.
17- Wasinski, B. 2007. Contribution of *Clostridium perfringens* type A with β2 toxin gene in aetiology of porcine enteric diseases. Bull Vet Inst Pulawy 51: 509-513.
18- Wojdat, E., K. Kwiatek and M. Kozak. 2006. Occurrence and characterization of some Clostridium species isolated from animal feedingstuffs. Bull Vet Inst Pulawy 50: 63-67.
19- Yoo, H. S., S. U. Lee, K. Y. Park and Y. H. Park. 1997. Molecular Typing and Epidemiological Survey of Prevalence of *Clostridium perfringens* Types by Multiplex PCR. Journal of clinical microbiology 35(1): 228-232.