DOI: 10.22092/VJ.2020.341410.1682
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

ارزیابی توکسین زایی کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D در سه نوع محیط کشت

• **علیرضا کریم آبادی زاده**
بخش تحقیق و تولید فرآورده های بیولوژیک شعبه جنوب شرق کشور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران
• **مهرداد شمس الدینی بافتی(نویسنده مسئول)**
بخش تحقیق و تولید فرآورده های بیولوژیک جنوب شرق کشور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۰-۲۳ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹-۰۵-۲۰
Email: m.shamsaddini@rvsri.ac.ir

چکیده

کلستریدیوم پرفرنجنس باعث ایجاد بیماری‌های زیادی در انسان و دام می‌شود. نوع توکسین‌های مترشحه، اساس طبقه‌بندی کلستریدیوم پرفرنجنس می‌باشد. یکي از مهم‌ترین توکسین‌ها، توکسین اپسیلون است که توسط تیپ D کلستریدیوم پرفرنجنس تولید مي‌شود. هدف از این تحقیق مقایسه توکسین‌زایی کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D در سه نوع محیط کشت است. تفاوت این سه محیط کشت در نوع پپتون و وجود پودر جگر تجاری به عنوان ماده مغذی و منبع تامین کننده پروتئین می‌باشد. در این تحقیق جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D را در سه محیط مغذي (A، B و C) کشت داده شد و پس از اطمینان از رشد، با استفاده از آزمایش‌های الیزا، حداقل دوز کشنده (Minimum Lethal Dose, MLD) و سنجش میزان پروتئین تام (Total Protein) میزان توکسین‌زایی مورد مقایسه قرار گرفت. میانگین میزان حداقل دوز کشنده نمونه‌ها در محیط کشت‌های A، B و C به ترتیب معادل ۱۲۱، ۸۹ و ۹۸ MLD/ml بود. همچنین میانگین مقدار پروتئین تام نمونه‌ها در محیط کشت‌های A، B و C به ترتیب معادل ۵۳، ۱۰۴/۴ و ۸۶/۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. با استفاده از آزمون آماری مشخص شد که بین مقادیر پروتئین تام و میزان حداقل دوز کشنده رابطه مستقیم وجود دارد. با بررسی نتایج بدست آمده مشخص شد که سه نوع محیط کشت مورد استفاده در رشد و تکثیر کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D جهت تولید توکسین اپسیلون مشابه بوده و از کشندگی یکسانی برخوردار بودند و به عبارتی امکان استفاده به عنوان جایگزین همدیگر وجود دارد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم پرفرنجنس، **توکسین، حداقل دوز کشنده، پروتئین تام**

Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 2-12

Evaluation of toxinogenesis of *Clostridium perfringens* type D isolates in three kinds of culture media

By: Karimabadizadeh, A. R., Biological Manufactures of Research & Production Department, South East Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran. and Shamsaddini Bafti, M., (Corresponding Author) Biological Manufactures of Research & Production Department, South East Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran.

Received: 2020-01-13 **Accepted: 2020-08-10**

Email: m.shamsaddini@rvsri.ac.ir

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) causes many diseases in humans and livestock. The kind of secreted toxins is the basis of *C. perfringens* classification. One of the most important toxins in the epsilon toxin produced by *C. perfringens* type D. The purpose of this study is evaluating the produce of *C. perfringens* type D epsilon toxin in three types of culture medium (A, B, and C). The differences between these three media are the type of peptone and commercial liver powder as the main nutrient and protein supplier. In this study, *C. perfringens* type D isolates cultured in three different nutrient culture mediums, after growth assurance, the suspensions used for evaluation of toxicity by Minimum Lethal Dose (MLD) test, total protein content and ELISA assays. The presence of alpha and epsilon toxins in media were confirmed by ELISA assay. The mean MLD values were 121, 89, and 98 MLD/ml in A, B, and C media, respectively. The mean total protein contents were 53, 86.7, and 104.4 mg/ml in A, B, and C, respectively. Statistical analysis showed there is a direct correlation between the results of the total protein contents and MLD values. The results showed the three types of culture media used in the growth and power of *C. perfringens* type D to produce epsilon toxin was similar, in other words, they can be used as alternatives.

Key words: *Clostridium perfringens,* toxin, minimum lethal dose, total protein

مقدمه

باکتری‌های بی‌هوازی به دو گروه هاگ‌دار و بدون هاگ تقسیم می‌شوند و جنس کلستریدیوم (*Clostridium*) جزء باکتری‌های بی‌هوازی هاگ‌دار است. تا به امروز بیش از ۲۰۰ گونه باسیل بی‌هوازی، گرم مثبت و مولد اسپور از جنس کلستریدیوم شناسایی شده است که در تمام جهان پراکنده‌اند. خصوصیات بیوشیمیایی این گونه‌ها متفاوت است و ارتباط ژنتیکی محدودی دارند (۶، ۱۱، ۲۲، ۳۱).

کلستریدیوم پرفرنجنس *(C. perfringens)* یکی از مهم‌ترین گونه های جنس کلستریدیوم می‌باشد. کلستریدیوم پرفرنجنس در بافت‌ها و بعضی محیط‌های کشت، کپسول دار می‌شود و از این نظر از سایر کلستریدیوم‌های بیماری‌زا متمایز می‌باشد. همچنین این باکتری برخلاف اکثر کلستریدیوم‌ها فاقد حرکت است. این باکتری مانند دیگر جنس‌های کلستریدیوم در کشت‌های جوان گرم مثبت است ولی در اثر کهنه شدن به‌تدریج گرم منفی می‌شود (۳۱). سویه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس حداقل ۲۰ نوع توکسین تولید می‌کنند که تمام آنها از جنس پروتئین هستند. سویه‌های منحصر به فردی، زیر مجموعه‌ای از توکسین‌ها را تولید می‌کنند که خاصیت پادگنی دارند. ترشح توکسین‌های آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا اساس طبقه‌بندی کلستریدیوم پرفرنجنس می‌باشد.

یکی از مهم‌ترین توکسین‌ها، توکسین اپسیلون می‌باشد که به وسیله تیپ‌های B و D تولید می‌شود (۱۸، ۲۹). توکسین اپسیلون اغلب منجر به یک انتروتوکسمی کشنده می‌گردد که با نفوذپذیری وسیع عروقی و تورم در قلب، شش‌ها، مغز و کلیه‌ها تشخیص داده می‌شود. این توکسین با تاثیر بر روی مغز، می‌تواند باعث تورم مغز و همچنین از طریق نکروز کردن بافت مغز باعث مرگ شود (۳۱). در روده کوچک حیوانات آلوده، توکسین به صورت پروتوکسین تولید می‌شود که توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک در روده کوچک فعال می‌شود. همچنین در شرایط آزمایشگاهی فعال‌سازی پروتوکسین توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند تریپسین ایجاد می‌شود. فعال شدن توکسین برای فعالیت کشندگی آن مهم و ضروری است که با افزایش نفوذپذیری در ناحیه روده کوچک و ورود به گردش خون و تاثیر بر روی بافت‌های هدف می‌باشد (۲۵). در این مطالعه توان توکسین‌زایی باکتری با استفاده از آزمایش‌های الیزا، حداقل دوز کشنده (Minimum Lethal Dose, MLD) و سنجش میزان

پروتئین تام (Total Protein) آزمایش شد (۲۶). باکتری‌ها نیازهای غذایی متفاوتی از جمله نیاز به کربن، نیتروژن، فسفر و یا سولفور جهت تامین انرژی مورد نیاز فعالیت و رشدشان دارند. محققین مختلفی در زمینه نوع محیط کشت و شرایط کشت تحقیق کردند (۴، ۵، ۲۱، ۳۰). جونیجا (Juneja) و همکاران (۲۰۰۶) تاثیر عصاره‌های مختلفی را بر روی رشد کلستریدیوم پرفرنجنس در فرآورده‌های دامی مورد مقایسه قرار دادند (۲۰). میوا (Miwa) و همکاران (۲۰۰۲) از محیط کشت‌های آزمایشگاهی مختلف جهت پایداری و توکسین‌زایی کلستریدیوم پرفرنجنس استفاده کرده‌اند (۲۳). در مراکز تولید فرآورده‌های بیولوژیک مرتبط با کلستریدیا، یکی از مهم‌ترین مشخصه‌های محیط کشت مورد استفاده در رشد و تکثیر باکتری، توانایی تولید مقادیر بیشتر توکسین در محیط کشت می‌باشد. یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای رسیدن به این هدف اضافه کردن ترکیباتی همچون پپتون و پپتون پروتئاز به محیط کشت است. پپتون یک ترکیب انحلال‌پذیر در آب است که از پلی‌پپتیدها و اسیدهای آمینه تشکیل شده که بدنبال هیدرولیز جزئی پروتئین بوجود می‌آید. پپتون پروتئاز در واقع توسط آنزیم‌ها و یا اسیدها به قسمت‌های کوچکتری تجزیه می‌شود. این ترکیبات منابع طبیعی اسیدهای آمینه مختلف جهت تولید ترکیباتی همچون توکسین در محیط کشت هستند و در واقع این مواد یک منبع غنی و مداوم نیتروژن را در محیط کشت تامین می‌کنند (۸، ۲۲). علاوه بر این پودر جگر یک ترکیب صنعتی بوده و به عنوان ترکیب غنی‌کننده محیط کشت رشد باکتری کاربرد دارد (۱). هدف از این تحقیق مقایسه توکسین‌زایی کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D در سه محیط کشت به منظور امکان کاربرد آن‌ها در تکثیر بهینه تر باکتری و تولید توکسین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت

جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D و سویه کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D استاندارد (CN_{409}) برروی محیط بلاد آگار و در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. در مرحله بعدی کلونی‌های گرد و صاف و کاتالاز منفی جهت تکثیر باکتری انتخاب شدند. این کلنی‌ها به محیط کشت نوترینت براث (۸ گرم در لیتر) حاوی تکه‌های جگر تلقیح شدند. محیط کشت‌ها همراه با اندیکاتور بی‌هوازی درون جار قرار داده شد و توسط دستگاه آنوکسومت (Mart ساخت کشور هلند) بی‌هوازی گردید (۲۸). پس از طی کردن مدت زمان انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تایید حضور باسیل گرم مثبت و خالص‌سازی، مراحل انجام پاساژ در محیط کشت حاوی عصاره جگر (۷۰ میلی‌لیتر در لیتر) ادامه پیدا کرد (۲۸). در این مرحله قبل از کشت بذر نهایی، سه نوع محیط کشت حاوی ترکیبات مختلف به شرح جدول ۱ تهیه گردید.

pH محیط کشت را در ۷/۶ تنظیم کرده و سپس در ارلن‌ها تقسیم گردید. پس از اتوکلاو و بمنظور اطمینان از استریل بودن، محیط‌ها بمدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۹، ۲۸). پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، از محتویات محیط کشت ارلن جگر به محیط کشت‌های نوع A، B و C به میزان ۱۰ درصد حاوی ۶×۱۰^{۷} پارتیکل در میلی‌لیتر اضافه شد. ارلن‌های کشت داده شده را داخل جار بی‌هوازی گذاشته و پس از ایجاد شرایط بی‌هوازی انکوباسیون انجام شد. از محیط کشت نوترینت براث حاوی کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D

جدول ۱- ترکیبات محیط کشت‌های A، B و C به ازای یک لیتر محیط کشت.

نام ماده		واحد	نوع محیط کشت		
فارسی	لاتین		A	B	C
پپتون گوشت	Meat Peptone	گرم	۳۰	۳۰	-
پپتون پروتوآز	Protease Peptone	گرم	-	-	۳۰
سدیم هیدروژن فسفات	Sodium Hydrogen Phosphate	گرم	۹/۳۰	۹/۳۰	۹/۳۰
دکسترین	Dextrin	گرم	۱۰	۱۰	-
مالتوز	Maltose	گرم	-	-	۱۰
عصاره مخمر	Yeast Extract	گرم	۵/۵۰	۵/۵۰	۵/۵۰
پودر جگر	Liver Powder	گرم	-	۷	-
سیستئین	Cysteine	گرم	۰/۲	۰/۲	۰/۲
سدیم کلرید	Chloride Sodium	گرم	۲/۴	۲/۴	۲/۴
تریس ویتامین	Trace Vitamin	میلی لیتر	۵/۵	۵/۵	۵/۵

استاندارد (CN_{409}) به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت نوترینت براث حاوی کلستریدیوم سپتیکوم (CN_{913}) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

آماده‌سازی توکسین

پس از گذشت یک شبانه‌روز گرمخانه‌گذاری، از هر کدام از محیط کشت‌ها، مقدار ۵ میلی‌لیتر برداشته و به لوله آزمایش استریل منتقل گردید. سپس بمدت ۲۵ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ، کم کم تمامی مایع‌رویی را به لوله آزمایش استریل حاوی ۰/۰۴ گرم تریپسین منتقل و به آرامی تکان داده شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۹، ۲۸).

سنجش توکسین

آزمایش الیزا

آزمایش الیزا جهت اطمینان از حضور تولید توکسین‌های آلفا و اپسیلون انجام شد. بر این اساس با استفاده از کیت‌های سنجش توکسین‌های آلفا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس ساخت شرکت Bio-X Diagnostic بلژیک و طبق دستورالعمل توصیه شده اقدام شد. اساس کیت بر تشخیص حضور توکسین با استفاده از پادگن مونوکلونال اختصاصی بر علیه توکسین که در ته چاهک‌های پلیت قرار داده شده، می‌باشد. جهت خوانش میکروپلیت‌ها از دستگاه الیزا ریدر مدل Wals Anthos ۲۰۲۰ استرالیا در طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده شد.

آزمایش حداقل دوز کشنده (MLD)

آزمایش حداقل دوز کشنده بعنوان شاخصی برای تعیین ۵۰ درصد کشندگی تعریف شده است. برای انجام این آزمایش پس از رقیق‌سازی با محلول بافر فسفات، مقدار نیم میلی‌لیتر از رقت‌های مناسب به دو سر موش سوری نژاد NMRI با وزن ۲۲ - ۱۸ گرم به صورت داخل سیاهرگی تزریق شد. پس از ثبت میزان مرگ و میر تا ۷۲ ساعت پس از تزریق، نتایج حداقل دوز کشنده بر اساس میزان تلفات محاسبه گردید (۱۹).

تعیین میزان پروتئین تام

جهت تعیین میزان پروتئین تام از رقت‌های مختلف توکسین استفاده شد. بدین منظور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Espect-2100، میزان جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر بدست آورده شد. سپس بر اساس فرمول مربوطه میزان پروتئین محاسبه گردید (۲۵).

روش‌های آماری

تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آزمون‌های آماری در نسخه ۲۱ نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. در بررسی آماری از آزمون ANOVA و از روش‌های Tukey و Duncan و آزمون One-Sample Test استفاده شد. همچنین از شاخص ضریب همبستگی جهت تعیین وابستگی نتایج استفاده شد.

نتایج

نتایج رشد باکتری در محیط کشت‌ها

بعد از اتمام زمان انکوباسیون کدورت محیط کشت‌ها نشان‌دهنده رشد مناسب باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس در هر سه محیط کشت بود.

نتایج الیزا

آزمایش الیزا جهت اطمینان از حضور تولید توکسین‌های آلفا و اپسیلون با استفاده از کیت‌های سنجش توکسین‌های آلفا و اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس انجام شد. میزان جذب نور توکسین‌های آلفا و اپسیلون سوسپانسیون باکتریایی با محیط کشت‌های متفاوت در جدول ۲ نشان داده شده است.

در بررسی آماری میزان جذب نور در سه نوع محیط کشت از آزمون ANOVA و از روش‌های Tukey و Duncan استفاده شد. مقادیر Sig بزرگتر از ۰/۰۵ بدست آمد، پس فرض H_0 پذیرفته می‌شود به عبارت دیگر میزان جذب نور توکسین‌ها نمونه‌ها در سه نوع محیط کشت اختلاف معنی‌داری ندارد (P-Value <۰/۰۵).

نتایج آزمایش حداقل دوز کشنده

بررسی میزان کشندگی توکسین تولید شده توسط جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D نشان می‌دهد که حداقل دوز کشنده نمونه‌ها از ۱۰ تا ۴۰۰ MLD در میلی‌لیتر متغیر بوده است. حداقل دوز کشنده توکسین تولید شده توسط سوش استاندارد تیپ D در محیط کشت‌های A، B و C به ترتیب معادل ۱۲۰۰۰، ۱۱۰۰۰ و ۱۲۰۰۰ MLD در میلی‌لیتر بدست آمد. حداقل دوز کشنده جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D در تمام انواع محیط کشت‌ها در مقایسه با سوش استاندارد تیپ D کمتر بدست آمد (جدول ۳).

در بررسی آماری حداقل دوز کشنده نمونه‌های مورد آزمایش در سه نوع محیط کشت، از آزمون آماری ANOVA با روش توکی (Tukey) استفاده شد. میانگین حداقل دوز کشنده در محیط کشت‌های A، B و C به ترتیب معادل ۱۰۷۷/۵۰، ۹۸۴/۱۷ و ۱۰۷۷/۵۰ MLD در میلی‌لیتر بدست آمد. بر این اساس، مقدار Sig معادل ۰/۹۹۷ و ۰/۹۴۹ بود و چون این مقادیر از ۰/۰۵ بیشتر می‌باشند پس فرض H_0 پذیرفته می‌شود و به عبارت دیگر میانگین حداقل دوز کشنده نمونه‌ها در سه محیط کشت اختلاف معنی‌داری ندارد (P-Value <۰/۰۵).

در بررسی آماری حداقل دوز کشنده نمونه‌های مورد آزمایش در مقایسه با حداقل دوز کشنده نمونه استاندارد در هر سه محیط کشت، از آزمون آماری One-Sample Test استفاده شد. بر این اساس، مقدار Sig نزدیک به صفر بدست آمد و چون این مقدار از ۰/۰۵ کمتر می‌باشد پس فرض H_1 پذیرفته می‌شود به عبارت دیگر میانگین حداقل دوز کشنده نمونه‌ها با میانگین حداقل دوز کشنده نمونه استاندارد اختلاف معنی‌داری دارد.

نتایج تعیین پروتئین تام

میزان پروتئین تام رقت‌های مختلف جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D مورد بررسی قرار گرفت. میانگین جذب نور نمونه‌ها برای طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بدست آمد (نمودار ۱).

در بررسی آماری میزان پروتئین تام در سه نوع محیط کشت از آزمون ANOVA و از روش‌های Tukey و Duncan استفاده شد. مقادیر Sig معادل ۰/۲۲۶ و ۰/۱۲۰ بدست آمد و چون این مقادیر کمتر از ۰/۰۵ نمی‌باشند پس فرض H_0 پذیرفته می‌شود به عبارت دیگر میانگین مقادیر

جدول۲- مقادیر جذب نوری نمونه‌ها در سه نوع محیط کشت A، B و C بر اساس آزمایش الیزا.

شماره نمونه	نوع محیط کشت	توکسین آلفا	توکسین اپسیلون
D_1	A	۸۶/۲	۱۳۷/۲
	B	۵۶/۲	۱۲۰/۵
	C	۶۷/۳	۱۵۹/۳
D_2	A	۲۰/۵	۳/۲
	B	۲۱/۴	۲/۳
	C	۱۸/۱	۱/۳
D_3	A	۱/۸	۲/۶
	B	۹/۳	۲/۱
	C	۱/۴	۱/۷
D_4	A	۱۳/۳	۹/۴
	B	۴/۶	۷/۸
	C	۱/۶	۱۱/۵
D_5	A	۱۸/۵	۱۴/۲
	B	۴/۵	۱۸/۷
	C	۶/۴	۱۷/۶
D_6	A	۳/۶	۱۴۲/۵
	B	۱/۸	۱۲۱/۵
	C	۶/۸	۱۱۲/۵
D_7	A	۷/۵	۱۳۲/۴
	B	۵/۴	۱۲۸/۵
	C	۴/۵	۱۳۰/۴
D_8	A	۸/۸	۱/۶
	B	۷/۷	۶/۵
	C	۴/۲	۴/۳
D_9	A	۱۳/۳	۳/۲
	B	۳/۲	۴/۲
	C	۲/۱	۵/۶
D_{10}	A	۱۵/۵	۱/۵
	B	۹/۳	۱/۸
	C	۱/۸	۱/۲

پروتئین تام نمونه‌ها در سه نوع محیط کشت اختلاف معنی‌داری ندارد (P-Value <۰/۰۵).

در بررسی آماری میزان پروتئین تام نمونه‌های مورد آزمایش در مقایسه با میزان میانگین پروتئین تام نمونه استاندارد در هر سه محیط کشت، از آزمون One-Sample Test استفاده شد. مقدار Sig نزدیک به صفر بدست آمد و چون این مقدار کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد پس فرض H_1 پذیرفته می‌شود به عبارت دیگر میانگین مقادیر پروتئین تام نمونه‌ها با میانگین پروتئین تام نمونه استاندارد اختلاف معنی‌داری دارد (P-Value <۰/۰۵).

تعیین ضریب همبستگی (Correlation) نتایج آزمایش‌های حداقل دوز کشنده وسنجش پروتئین تام

در بررسی آماری تعیین حداقل دوز کشنده و پروتئین تام نمونه‌های مورد آزمایش از آزمون تعیین ضریب همبستگی استفاده شد (جدول ۴).

بر این اساس ضریب همبستگی معادل ۰/۸۸۷ بدست آمد که در نتیجه ارتباط بین آزمایش‌های حداقل دوز کشنده و میزان پروتئین تام ارتباط مستقیمی می‌باشد. مقدار Sig نزدیک به صفر بدست آمد و چون این مقدار کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد پس فرض H_1 پذیرفته می‌شود به عبارت دیگر مقادیر حداقل دوز کشنده و مقادیر پروتئین تام نمونه‌ها به هم وابسته هستند (P-Value <۰/۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر کنترل بیماری‌های ناشی از کلستریدیوم پرفرنجنس در کشور با واکسیناسیون دام‌ها انجام می‌شود و از آنجائی‌که افزایش ایمنی‌زایی واکسن در ارتباط با میزان توکسین غیرفعال شده موجود در آن می‌باشد هر عاملی که بتواند تولید توکسین را افزایش دهد به همان نسبت میزان اثربخشی واکسن را افزایش خواهد داد (۲۷). تیپ‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس، بیماری‌های گوناگونی را در دام‌ها ایجاد می‌کنند و حتی ممکن است یک تیپ، بیماری‌های متفاوتی را در میزبان‌های مختلف ایجاد کند. ون استن (Van Asten) و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که اختلافات در بیماری‌زایی سویه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس ارتباط نزدیکی با تولید توکسین دارد (۳۳).

سنجش حضور توکسین‌های آلفا و اپسیلون با استفاده از روش الیزا نیز انجام گرفت. از این روش محققین مختلفی برای تعیین تیپ باکتری در محتویات روده استفاده کردند. گوکسی (Gokce) و همکاران (۲۰۰۷) میزان شیوع انتروتوکسمی را با استفاده از روش الیزا بین ۵۰ تا ۸۳/۶۳ درصد بدست آورند. آن‌ها تیپ‌های A، B، C و D کلستریدیوم پرفرنجس را در محتویات روده گوسفندان بیمار تشخیص دادند اما تیپ D بیشترین شیوع را نشان داد (۱۶). نایلر (Naylor) و همکاران (۱۹۹۷) از روش الیزا برای تشخیص توکسین آلفا کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ A در محتویات روده و محیط کشت‌ها برای تفریق تیپ‌های مختلف استفاده کردند (۲۴). گارسیا (Garcia) و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از روش الیزا میزان توکسین اپسیلون را در جدایه‌های وحشی کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D از صفر تا ۵/۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش کردند (۱۴). اوزل (Uzal) و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که روش‌های غیرمستقیم و رقابتی الیزا جهت تشخیص سریع، ساده، حساس و اختصاصی برای تعیین تیتر آنتی‌بادی بر علیه کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D در سرم ارزشمند است (۳۲).

بر اساس نتایج بدست آمده در این پروژه در مورد درصد توکسین‌های آلفا و اپسیلون در محیط کشت‌ها پایه، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در روش الیزا توانایی تولید توکسین این جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت چون گاهی اوقات سویه جدا شده ژن توکسین خاص را دارد ولی در شرایط محیطی قادر به تولید آن نمی‌باشند چرا که حضور توکسین بستگی به میزان باکتری و توانایی سنتز و ترشح توکسین دارد.

تعیین حداقل دوز کشنده یک روش مناسب جهت بررسی میزان توکسین تولید شده توسط باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D در محیط کشت می‌باشد (۲۶). محققین مختلفی در زمینه نوع محیط کشت و شرایط کشت کلستریدیوم پرفرنجنس تحقیق کردند (۵، ۷، ۱۵، ۲۰). جونیجا و همکاران (۲۰۰۶) تاثیر عصاره‌های مختلفی را بر روی رشد کلستریدیوم پرفرنجنس در فرآورده‌های دامی مورد مقایسه قرار دادند (۱۹). تاناکا (Tanaka) و همکاران (۲۰۰۰) از محیط تجاری پودر جگر جهت بررسی خصوصیات برخی از باکتری‌ها استفاده کردند (۲۹). میوا و همکاران (۲۰۰۲) از محیط کشت‌های آزمایشگاهی مختلف جهت

ادامه جدول۲- مقادیر جذب نوری نمونه‌ها در سه نوع محیط کشت A، B و C بر اساس آزمایش الیزا.

شماره نمونه	نوع محیط کشت	توکسین آلفا	توکسین اپسیلون
D_{11}	A	۸/۸	۱۱۲/۴
	B	۹/۷	۱۰۵/۵
	C	۵/۶	۹۸/۳
سوش استاندارد	A	۳۲/۹	۱۵۶/۲
	B	۲۸/۶	۱۶۵/۵
	C	۳۰/۳	۱۴۶/۶

جدول ۳- نتایج حداقل دوز کشنده جدایه‌ها و سوش استاندارد کلستریدیوم پرفرنجنس **تیپ D در انواع محیط کشت‌ها.**

شماره نمونه	نوع محیط کشت	تلفات حیوانات آزمایشگاهی براساس رقت	حداقل دوز کشنده
D_1	A	۱(۱/۱۰۰)	۱۰۰
	B	۲(۱/۵۰)	۷۵
	C	۱(۱/۱۰۰)	۱۰۰
D_2	A	۲(۱/۱)	۵
	B	۲(۱/۱)	۵
	C	۲(۱/۱)	۵
D_3	A	۲(۱/۱۰)	۳۰
	B	۲(۱/۱۰)	۳۰
	C	۲(۱/۱)	۵
D_4	A	۲(۱/۱)	۵
	B	۲(۱/۱)	۵
	C	۱(۱/۱۰)	۱۰
D_5	A	۱(۱/۵۰)	۵۰
	B	۲(۱/۵۰)	۷۵
	C	۱(۱/۵۰)	۵۰
D_6	A	۱(۱/۴۰۰)	۴۰۰
	B	۲(۱/۱۰۰)	۱۵۰
	C	۲(۱/۱۰۰)	۱۵۰
D_7	A	۲(۱/۲۰۰)	۳۰۰
	B	۱(۱/۲۰۰)	۲۰۰
	C	۲(۱/۲۰۰)	۳۰۰
D_8	A	۲(۱/۱)	۵
	B	۲(۱/۱)	۵
	C	۲(۱/۱)	۵
D_9	A	۲(۱/۱۰)	۳۰
	B	۲(۱/۱۰)	۳۰
	C	۱(۱/۵۰)	۵۰
D_{10}	A	۲(۱/۱)	۵
	B	۲(۱/۱)	۵
	C	۲(۱/۱)	۵

پایداری و توکسین‌زایی کلستریدیوم پرفرنجنس در مواد غذایی استفاده کرده‌اند (۲۲). همچنین تعدادی از محققین از پودر جگر به منظور بررسی خصوصیات رشد گونه‌های مختلف کلستریدیا استفاده کردند (۴). اردهالی و همکاران (۱۹۹۲) از دو نوع محیط که یکی حاوی پودر جگر بوده جهت تهیه و تولید واکسن چند تایی انتروتوکسمی استفاده کردند (۲). اوزال و همکاران (۲۰۰۳) روش‌های مختلف تشخیص توکسین اپسیلون همچون الیزا را همراه با آزمایش حداقل دوز کشنده به کار بردند بطوری‌که در مواردی که میزان حداقل دوز کشنده معادل ۲۵ و ۰/۷۵ MLD در میلی‌لیتر باشد با روش الیزا حاوی پادگن مونوکلونال اختصاصی، قابل تشخیص داده شد (۳۵).

بر اساس نتایج پژوهش، میزان توکسین تولید شده توسط نمونه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D و سوش استاندارد کشت داده شده در سه نوع محیط کشت مختلف با استفاده از آزمایش حداقل دوز کشنده اختلاف معنی‌داری ندارد. بر پایه نتایج این تحقیق می‌توان گفت محیط کشت‌های مورد استفاده برای تولید توکسین تفاوتی ندارند و می‌توان در بحث کشت و تکثیر کلستریدیوم پرفرنجنس جایگزین یکدیگر شوند. همچنین با توجه به نتایج اندازه‌گیری مقادیر پروتئین تام در سه نوع محیط کشت، و ارزیابی آماری می‌توان گفت بین این محیط کشت‌ها نیز اختلاف معنی‌داری ندارند.

علاوه بر این حداقل دوز کشنده بدست آمده نمونه‌ها با مقادیر بدست آمده در خصوص نمونه استاندارد اختلاف معنی‌داری دارد و در اغلب نمونه‌ها این میزان کمتر از نمونه استاندارد بود و فقط در سه نمونه این مقدار بین ۱۵۰ تا ۳۰۰ بدست آمد که با سوش استاندارد اختلاف معنی‌داری دارد بعبارت دیگر میزان توکسین‌زایی جدایه‌های باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D در این نمونه خیلی کمتر از نمونه استاندارد بود و متأسفانه نمی‌توان از آنها به عنوان جایگزین نمونه استاندارد استفاده نمود. الشورباگی (El-Shorbagy) و همکاران (۲۰۱۲) آزمایش MLD را برای ارزیابی میزان کشندگی توکسین آلفا از تیپ A و توکسین اپسیلون از تیپ D کلستریدیوم پرفرنجنس جداشده از گوسفند و بز در موش انجام دادند. این محققین گزارش کردند که حداقل دوز کشنده برای تیپ A، یک به ۱۶ و برای تیپ D، یک به ۱۸ بود (۹).

فهمی (Fahmy) و همکاران (۲۰۱۰) MLD توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنجنس را مورد بررسی قرار دادند و موش‌های مورد آزمایش به مدت سه روز تحت نظر قرار گرفتند و MLD را برای بالاترین رقتی از توکسین که موش را در مدت معین شده می‌کشت، تعیین کردند (۱۰). السهامی (El-Sehamy) (۲۰۱۱) دامنه میزان MLD را برای توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرنجنس از یک به ۱۰ تا یک به ۱۲۰۰، توکسین بتا کلستریدیوم پرفرنجنس از یک به ۱۰ تا یک به ۴۰۰، توکسین آلفا کلستریدیوم نوآی از یک به ۱۰ تا یک به ۵۰ و توکسین آلفا کلستریدیوم سپتیکوم از یک به ۲۰ تعیین کردند (۸). گونکالو (Gonçalves) و همکاران (۲۰۰۹) میزان MLD در سویه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس انتخابی با روش دات بلات (Dot-blot) را بین ۲۰۰ تا ۷۳۰ MLD در میلی‌لیتر بدست آوردند (۱۷).

در پژوهشی دیگر از حیوانات آزمایشگاهی با وزن ۲۲-۱۸ گرم به منظور مطالعه عوامل بیماری‌زا با تزریق وریدی تهیه شده از مایع‌رویی کشت رویشی تیپ D کلستریدیوم پرفرنجنس (توکسین اپسیلون خالص‌شده) استفاده کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که تزریق وریدی مدل حیوان آزمایشگاهی برای مطالعه اثرات سیستمیک توکسین اپسیلون مفید بوده و این گونه‌ها به توکسین‌های تیپ D حساس می‌باشند. این محققین از توکسین اپسیلون با دوز پنجاه درصد کشندگی در موش‌ها استفاده کردند. همچنین آن‌ها دریافتند که هر چه حداقل دوز کشنده بیشتر باشد باکتری مورد نظر توکسین بیشتری تولید می‌کند، بنابراین واکسن تولید شده ایمنی‌زایی بیشتری در دام ایجاد می‌کند که این امر از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد (۱۲).

ادامه جدول ۳- نتایج حداقل دوز کشنده جدایه‌ها و سوش استاندارد کلستریدیوم پرفرنجنس **تیپ D در انواع محیط کشت‌ها.**

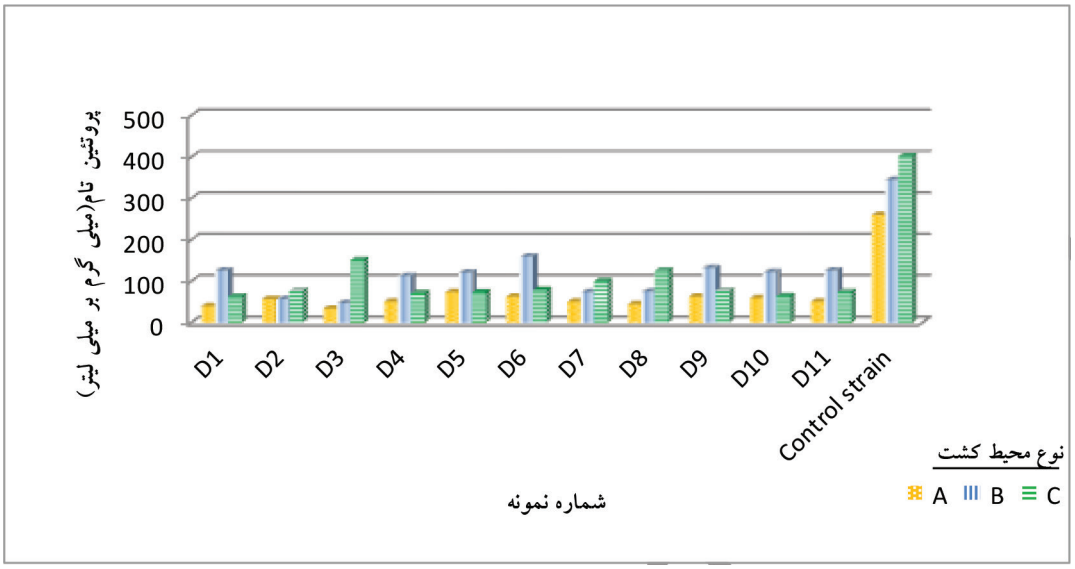
شماره نمونه	نوع محیط کشت	تلفات حیوانات آزمایشگاهی براساس رقت	حداقل دوز کشنده
D_{11}	A	۱(۱/۴۰۰)	۴۰۰
	B	۱(۱/۴۰۰)	۴۰۰
	C	۱(۱/۴۰۰)	۴۰۰
سوش استاندارد	A	۱(۱/۱۲۰۰۰)	۱۲۰۰۰
	B	۲(۱/۱۰۰۰۰)	۱۱۰۰۰
	C	۱(۱/۱۲۰۰۰)	۱۲۰۰۰

اختلافاتی که در میزان کشندگی توکسین اپسیلون برای تیپ D کلستریدیوم پرفرنجنس مشاهد می‌شود، می‌تواند بدلیل متفاوت بودن سویه، روش کار و استفاده از دستورالعمل‌های متفاوت و یا محیط کشت‌های مختلف بوده که بر نتایج بدست آمده تاثیر گذاشته است (۱۳).

در پژوهشی که جهت بررسی‌های بیماری‌زایی تیپ‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس جداسازی شده از ۳۰ عدد حیوان آزمایشگاهی استفاده شد. حیوانات آزمایشگاهی به سه گروه مساوی تقسیم شده که یک گروه به عنوان گروه شاهد و به دو گروه دیگر از مایع‌روئی محیط کشت حاوی توکسین به ترتیب مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر بصورت تزریق داخل پوست و ۰/۵ میلی‌لیتر بصورت داخل عضلانی تزریق شد. سپس از بافت‌های جگر، قلب، کلیه، روده، مغز و طحال حیوان آزمایشگاهی جهت انجام آزمایش‌های مختلف باکتری شناسی و تزریق به حیوان آزمایشگاهی دیگری استفاده شد (۳).

آزمایش سنجش میزان پروتئین تام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. روش‌های اسپکتروفتومتری به دلیل چندین مزایا از قبیل شروع آسان، کم خرج بودن و صرف مدت زمان کمتر و امکان استفاده

نمودار۱- هیستوگرام مقایسه‌ای نتایج میانگین پروتئین تام بر اساس میزان جذب نور جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس **تیپ D.**



جدول۴- تعیین ضریب همبستگی نتایج آزمایش‌های حداقل دوز کشنده و سنجش پروتئین تام.

		حداقل دوز کشنده	پروتئین تام
حداقل دوز کشنده	Pearson Correlation	۰/۸۸۷*	۱
	Sig. (2-tailed)	۰/۰۰۰	
	N	۳۶	
پروتئین تام	Pearson Correlation	۱	۰/۸۸۷*
	Sig. (2-tailed)		۰/۰۰۰
	N		۳۶

=* نشاندهنده وجود اختلاف در سطح (P-Value <۰/۰۱)

از محلول‌های ساده در مقایسه با بیشتر روش‌های دیگر بعنوان یک روش رایج در بیشتر کشورها ارجحیت دارند. با توجه به اینکه محلول پایه رقت‌سازی سرم فیزیولوژی بود از همین محلول جهت کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. بطور کلی در این آزمایش، تمام پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری در دو طول موج متفاوت (۲۶۰و۲۸۰ نانومتر) اندازه‌گیری شدند. اما در این بررسی، نمونه‌ها حاوی تریپسین بودند. تریپسین برای توکسین آلفا تولید شده توسط کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D نقش کاتالیزوری دارد و انکوباسیون باعث می‌شود که این توکسین از حالت غیرفعال به حالت فعال تبدیل شود و در این مرحله است که این توکسین سبب بیماری در حیوان آزمایشگاهی و در نهایت مرگ آنها می‌شود زیرا که بر اساس آزمون ضریب همبستگی مقادیر آزمایش حداقل دوز کشنده رابطه مستقیم با مقادیر پروتئین تام دارد. پس می‌توان این نکته را یادآور شد، پروتئین تام که توسط اسپکتروفتومتر در این تحقیق اندازه‌گیری شده است بطور عمده توکسین اپسیلون فعال است. با نتایجی که از سنجش پروتئین تام در این آزمایش بدست آمد، میزان پروتئین تام در نمونه‌ها و کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد اما از طرفی دیگر نمی‌توان گفت که نتایج بدست آمده فقط مربوط به توکسین اپسیلون است بلکه ممکن است توکسین‌های دیگر نیز، هنوز در محیط مورد آزمایش توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شده باشند.

با توجه به اینکه آزمایش حداقل دوز کشنده یک روش مناسب جهت سنجش کشندگی توکسین در محیط‌های آزمایشگاهی می‌باشد و همچنین استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دقت مناسبی را در سنجش میزان پروتئین تام تولید شده توسط باکتری بدست می‌آورد و با بررسی نتایج بدست آمده از آزمایش‌های فوق، به نظر می‌رسد که سه نوع محیط کشت مورد استفاده در رشد و تکثیر کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ D جهت تولید توکسین اپسیلون مشابه بوده و از کشندگی یکسانی برخوردار است و به عبارتی امکان استفاده به عنوان جایگزین همدیگر وجود دارد. علاوه بر این استفاده از محیط کشت نوع C به منظور تکثیر کلستریدیوم پرفرنجنس مقرون به صرفه نیست و لذا توصیه نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب اجرای پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۶۰۰۸۹-۰۰۳-۱۸-۲-۸۵ مورد حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی انجام گرفته است. از همکاران موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه کرمان که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1- Ardehali, M., M. Moosawi and R. Pilahian. 1994. Isolation of Toxigenic Strains of *Clostridium perfringens* from the soil of farms in Iran. *Arch Razi Inst* 44: 95-100.

2- Ardehali, M., M. Moosawi and R. Pilehchian. 1992. Mass production of *Clostridium oedematiens* vaccine against Black disease of sheep. *Liver* 2: 4.

3- Bahl, H. and P. Dürre. 2001. Clostridia: Biotechnology & Medical Applications. John Wiley & Sons.

4- Baird-Parker, A. and B. Freame. 1967. Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and vegetative cell inocula. *Journal of Applied Bacteriology* 30: 420-429.

5- Byrne, B., A. Scannell, J. Lyng and D. Bolton. 2008. An evaluation of *Clostridium perfringens* media. *Food Control* 19: 1091-1095.

6- Cato, P. 1986. Genus Clostridium, 23AL. Bergey's manual of systematic bacteriology 2: 1144-1200.

7- De Jong, A., G. Eijhusen, E. Brouwer-Post, M. Grand, T. Johansson, T. Kärkkäinen, J. Marugg, P. Veld, F. Warmerdam and G. Wörner. 2003. Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods. *Journal of Microbiological Methods* 54: 359-366.

8- El-Sehamy, M. 2011. Some factors affecting the production and biological activity of *Clostridium septicum* alpha toxin used in vaccine preparation. *Benha Veterinary Medical Journal* 1: 102-107.

9- El-Shorbagy, M., M. L.Reda and H. Mona. 2012. Prevalence of Clostridium perfringens Alpha toxin in processed and unprocessed fish. *Int J of Microbiol Res* 3: 195-199.

10- Fahmy, A., K. Mohamed, A. Samir, M. Ashgan, A. Azab and S. Selim. 2010. Preparation of a combined vaccine for clostridial diseases and rabies in sheep. *Global Veterinaria* 4: 463-473.

11- Fathi Najafi, M., M. Mashhadi and M. Hemmaty. 2020. Effectiveness of Chitosan Nanoparticles in Development of Pentavalent Clostridial Toxoid Vaccine in Terms of Clinical Pathology Elements and Immunological Responses. *Archives of Razi Institute*. 75: 385-395.

12- Fernandez-Miyakawa, M. E., B. H. Jost, S. J. Billington and F. A. Uzal. 2008. Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model. *Veterinary Microbiology* 127: 379-385.

13- Fernandez-Miyakawa, M. E., S. Sayeed, D. J. Fisher, R. Poon, V. Adams, J. I. Rood, B. A. McClane, J. Saputo and F. A. Uzal. 2007. Development and application of an oral challenge mouse model for studying *Clostridium perfringens* type D infection. *Infection and Immunity* 75: 4282-4288.

14- Garcia, J., V. Adams, J. Beingesser, M. Hughes, R. Poon, D. Lyras, A. Hill, B. A. McClane, J. Rood and F. A. Uzal. 2013. Epsilon toxin is essential for the virulence of *Clostridium perfringens* type D infection in sheep, goats, and mice. *Infection and Immunity* 81: 2405-2414.

15- Gibson, A. M. and T. Roberts. 1986. The effect of pH, sodium

chloride, sodium nitrite and storage temperature on the growth of *Clostridium perfringens* and faecal streptococci in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology* 3: 195-210.

16- Goekce, H. I., O. Genç, M. Soezmen and G. Gökçe. 2007. Determination of *Clostridium perfringens* toxin-types in sheep with suspected enterotoxemia in Kars Province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31: 355-360.

17- Gonçalves, L. A., Z. I. Lobato, R. O. Silva, F. M. Salvarani, P. S. Pires, R. A. Assis and F. C. Lobato. 2009. Selection of a *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin producer via dot-blot test. *Archives of Microbiology* 191: 847.

18- Gurjar, A., N. Hegde, B. Love and B. 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 Cellular Probes* 22: 90-95.

19- SOP, 2019, Method of derermination of minimum lethal dose of *Clostridium perfringens* type D, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, KBR.0105.SOP.

20- Juneja, V., F. Xuetong, A. Peña-Ramos, M. Diaz-Cinco and R. Pacheco-Aguilar. 2006. The effect of grapefruit extract and temperature abuse on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula in marinated, sous-vide chicken products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7: 100-106.

21- Juneja, V. K., H. Marks and H. Thippareddi. 2008. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured beef. *Food Microbiology* 25: 42-55.

22- Mainil, J. 2006. Genus Clostridium-Clostridia in medical, veterinary and food microbiology: *Diagnosis and typing*,control of infectious diseases, European Communities, Printed in Luxembourg.

23- Miwa, N., T. Masuda, A. Kwamura, K. Terai and M. Akiyama. 2002. Survival and growth of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative *Clostridium perfringens* in laboratory media. *International journal of Food Microbiology* 72: 233-238.

24- Naylor, R. D., P. K. Martin and L. T. Barker. 1997. Detection of *Clostridium perfringens* α toxin by enzyme-linked immunosorbent assay. *Research in Veterinary Science*, 63: 101-102.

25- Paktinat, M., M. Khodabandeh, B. M. Amiri and H. Farahmand. 2012. A Simple method for purification of low levels of Beluga (Huso huso) vitellogenin. International Conference on Applied Life Sciences. InTech.

26- Pilehchian Langroudi, R. 2014. *Clostridium perfringens* Type D epsilon prototoxin and toxin effects on the mouse body weight. *Int J Enteric Pathog* 2: 1-6.

27- Pilehchian Langroudi, R. 2015. Isolation, specification, molecular biology assessment and vaccine development of Clostridium in Iran: a review. *Int J Enteric Pathog* 3: 1-7.

28- Rocha, P., R. Assis, F. Lobato, V. Cardoso and L. Heneine. 2008. Stability and toxicity of *Clostridium perfringens* type D epsilon prototoxin treated by iodine. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 821-824.

29- Rood, J. I., V. Adams, J. Lacey, D. Lyras, B. A. McClane, S. B. Melville, R. J. Moore, M. R. Popoff, M. R. Sarker and J. G. Songer. 2018. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53: 5-10.

30- Tanaka, H., H. Hashiba, J. Kok and I. Mierau. 2000. Bile salt hydrolase of Bifidobacterium longum-biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2502-2512.

31- Uzal, F.A., J.G. Songer, J.F. Prescott and M.R. Popoff. 2016. Clostridial diseases of animals. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ.

32- Uzal, F. A., K. Nielsen and W. Kelly. 1997. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Veterinary Microbiology* 57: 223-231.

33- Uzal, F. A., W. Kelly, R. Thomas, M. Hornitzky and F. Galea. 2003. Comparison of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15: 94-99.

34- Van Asten, A.J., J.G. Allaart, A.D. Meeles, P.W. Gloudemans, D.J. Houwers and A.Gröne. 2008. A new PCR followed by MboI digestion for the detection of all variants of the Clostridium perfringens cpb2 gene. *Veterinary Microbiology* 127(3-4):412-6.

35- 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: 228-232.