

## شناسایی مولکولی و ارزیابی توکسین زایی سویه‌های کلسترید یوم پرفرینجنز تیپ D جدا شده از موارد آنتروتوکسمی در موسسه رازی

لیدا عبدالمحمدی خیاو<sup>۱</sup>، احمد رضا جباری<sup>\*۲</sup>، رضا پیله چیان لنگرودی<sup>۲</sup>

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی بخش تولید واکسن‌های باکتریایی بیهوازی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان

تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- دانشیار بخش تولید واکسن‌های باکتریایی بیهوازی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج

کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ: ۹۳/۱۰/۱۷ پذیرش: ۹۶/۸/۲۴

### چکیده

باکتری کلسترید یوم پرفرینجنز عامل بیماری آنتروتوکسمی در گوسفند می‌باشد. هدف از این مطالعه انتخاب بهترین سویه کلسترید یوم پرفرینجنز تیپ D از ایران و مقایسه آن با سویه واکسینال به وسیله تست‌های پتنسی و MLD است. در این تحقیق، ۱۵ سویه تیپ D مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا آزمایشات میکروبیولوژی و بیوشیمیایی انجام شد، سپس نمونه‌ها به وسیله تست PCR تأیید شدند. در نهایت بهترین سویه‌ها به وسیله MLD انتخاب شد و واکسن آنتروتوکسمی از نمونه سویه واکسینال و این سویه‌ها تهیه شد. واکسن برای مدت ۴۵ روز در یخچال نگهداری شد. سپس تست پتنسی طبق دستورالعمل‌های استاندارد بر روی نمونه‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که شرایط توکسین اپسیلون واکسن سویه‌های جدا شده در موسسه رازی با توکسین اپسیلون نمونه واکسن سویه واکسینال برابر می‌باشد.

### کلمات کلیدی: کلسترید یوم پرفرینجنز، PCR، MLD، Potency، واکسن تتراولان

\*نویسنده مسئول: احمد رضا جباری

بخش تولید واکسن‌های باکتریایی بیهوازی، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. تلفن: ۰۲۶-۳۴۵۷۰۰۳۸

پست الکترونیک: a.jabbari@rvsri.ac.ir

## مقدمه

کلستریدیوم در خانواده باسیلاسه قرار می‌گیرد که یکی از جنس‌های مهم آن پرفرینجنز می‌باشد. این باکتری عامل بیماری انتروتوکسمی در گوسفند می‌باشد که یک بیماری حاد عفونی بوده و باعث همه‌گیری می‌شود. توکسین‌های اصلی این باکتری شامل  $\alpha$ ،  $\beta$ ،  $\epsilon$  و  $\iota$  می‌باشد. مهم‌ترین توکسین تولید شده توسط همه تیپ‌های کلستریدیوم پرفرینجنس، توکسین  $\alpha$  می‌باشد که یک لیسیتیناز است. این توکسین نفوذپذیری عروق را افزایش داده و منجر به همولیز و خونریزی گسترده، تخریب بافتی و میونکروز می‌شود. توکسین  $\beta$  عامل بروز ضایعات نکروزی در انتریت نکروز دهنده است. (انتریت نکروتیک) توکسین  $\epsilon$  یک پروتوکسین می‌باشد که به وسیله تریسین فعال می‌شود و نفوذپذیری عروق دیواره دستگاه گوارش را افزایش می‌دهد. توکسین  $\iota$  دارای فعالیت نکروزی است و نفوذپذیری عروق را افزایش می‌دهد. این باکتری بر اساس توکسین‌های اصلی به ۵ تیپ A تا E تقسیم می‌شود. اولین مورد عفونت کلستریدیایی در سال ۱۹۳۶ گزارش شد (۱۲). مطالعات بیشتر موید عفونت وسیع و گسترده در سراسر کشور برای سالها بود (۴). از سال ۱۹۵۰ تشخیص عامل عفونت کلستریدیایی توسط دکتر رفیعی و اردهالی گزارش شد (۱۷) و بیش از ۱۱۰ سویه توکسیژنیک در موسسه رازی جداسازی شد (۲) و (۵). برخی از بیماری‌های ناشی از باکتری‌های بی‌هوازی کلستریدیایی که در موسسه رازی تشخیص داده شده‌اند شامل اسهال عفونی بره‌های نوزاد، استراک گوسفند‌های بالغ، قلوه نرمی یا آنتروتوکسمی بز و گوسفند‌های بالغ و یراکسی گوسفند‌های بالغ است. اولین واکسن تولید شده، واکسن شاربن علامتی گاو بود که در سال ۱۹۳۵ برای مبارزه با کلستریدیوم شوئی

تهیه گردید. سپس واکسن چندتایی آنتروتوکسمی گوسفند و بز در سال ۱۹۴۴ تولید گردید (۳). در سال ۲۰۱۱ دکتر پیله چیان واکسن فیوژن از ژنهای توکسین اسپیلون و بتا در باکتری *E. coli* تولید نمود (۱۶) و (۱۵). در ایران گونه‌های مختلف کلستریدیوم پرفرینجنز از منابع مختلفی مانند خاک و نمونه‌های دامی جدا شده است (۵). در مطالعه حاضر سویه‌های فیلدی کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D جداسازی شده در موسسه رازی از لحاظ قابلیت توکسین‌زایی و سپس مقایسه پتنتی آن با سویه واکسینال بررسی و مطالعه گردید.

## مواد و روش کار

سویه‌های باکتریایی: از ۱۵ سویه تیپ D و ۱ سویه واکسینال از کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D برای مقایسه توکسین‌زایی استفاده شد.

تست‌های تاییدی سویه‌های باکتریایی ایزوله شده: در مطالعه حاضر از تست فرمنتیشن برای قندهای گلوکز، مالتوز، مانیتول، ساکارز، سالیسین و لاکتوز و تست‌های ژلاتیناز، لیسیتیناز، مورفولوژی کلنی و مشاهده همولیز بر روی بلاد آگار در شرایط بیهوازی و تهیه اسلاید و تست کاتالاز از کلونی ایزوله شده در محیط تایو گلیکولات جامد استفاده شد. سپس تست PCR به منظور تأیید نهایی بر روی سویه‌ها انجام گرفت.

جهت انجام PCR ابتدا DNA را تخلیص می‌نماییم. برای این منظور نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ نموده سپس مایع رویی را اوت می‌کنیم. پلت را با سرم فیزیولوژی شستشو داده مجدداً در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌نماییم و دوباره پلت را با سرم فیزیولوژی شستشو می‌دهیم. سپس مجدداً سانتریفوژ و نهایتاً بر روی پلت PCR بافر IX می‌ریزیم و به مدت ۲۰ دقیقه بویلینگ را انجام



لوله‌ها مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت تا نوترالیزاسیون بین توکسین و آنتی سرم انجام شود. سپس هررقت به دو موش N. M. R. I به وزن ۱۷-۲۲ گرم به میزان ۰/۵ میلی لیتر به صورت داخل وریدی به دم تزریق شد. در نهایت میزان آنتی توکسین بر حسب واحد بین الملل با بستن تناسب با مقایسه آنتی توکسین استاندارد و آنتی سرم واکسینال یا آنتی سرم فیلدی محاسبه شد (۸).

### نتایج

سویه‌های جدا شده کلاستریدایوم پرفریجنز قادر به تخمیر قندهای گلوکز، مالتوز، لاکتوز و سوکروز بودند. ولی توانایی تخمیر قند سالیسین و مانیتول را نداشتند. همگی ژلاتیناز و لیستیناز مثبت و کاتالاز منفی (بیهوازی) بودند. تمامی سویه‌ها بر روی محیط کشت بلاد آگار کلنی خاکستری با همولیز بتا ایجاد کرده و در اسلاید باسیل گرم مثبت مشاهده شد. مناسب‌ترین محیط کشت، محیط کشت مدیفای شده در بخش بیهوازی و مناسبترین زمان جهت تست، ۵ ساعت پس از کشت انتخاب شد.

توکسین اپسیلون در ۴۰۰ کیلو باز، توکسین آلفا در ۹۰۰ کیلو باز و توکسین بتا در ۶۱۱ کیلو باز و در کنترل منفی بانندی دیده نشد. نتیجه PCR در تصویر ۱ نشان داده شد.

با توجه به نتایج MLD سویه‌های فیلدی D<sub>458</sub> بالاترین میزان توکسین زایی را داشت (جدول شماره ۲).

تست استریلیتی دو واکسن نشان داد که آلودگی به سایر باکتریها و قارچها ندارند و همگی یک نوع باکتری خالص دارند. نتایج بی ضرری و عدم سمیت غیر عادی واکسن نشان داد که عارضه‌ای در گوسفندان و موشها ایجاد نشد و واکسن تهیه شده بی ضرر می‌باشد. نتایج نشان داد که در رقت ۰/۵ آنتی توکسین

تست بی ضرری: از دو واکسن به میزان ۵ و ۱۰ میلی لیتر به دو رأس گوسفند ۴۰ کیلوگرمی به ناحیه بالای کتف به صورت زیر جلدی تزریق نموده و گوسفندان به مدت ۱۴ روز تحت نظر قرار گرفتند (۷).

عدم سمیت غیر عادی واکسن: از دو واکسن به میزان ۰/۵ میلی لیتر به ۵ موش NIH به صورت زیر جلدی در ناحیه پا تزریق نموده و موشها به مدت ۷ روز تحت نظر قرار گرفتند (۷).

پس از مدت ۴۵ روز از تولید واکسن تست پتنسی در مقایسه با سویه‌های واکسینال انجام شد.

تست پتنسی: نمونه دو واکسن به ۱۲ خرگوش به وزن ۳ کیلوگرم به میزان ۳ میلی لیتر به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت گردن تزریق شد. پس از ۲۸ روز تکرار تزریق و ۱۴ روز بعد خونگیری از قلب خرگوش انجام شد. سپس سرم جدا و بر روی آن تست پتنسی انجام شد.

### مراحل تست پتنسی شامل:

۱- آماده سازی محلول توکسین: ۲ میلی لیتر محلول توکسین اپسیلون را با ۲۰ میلی گرم تریپسین مخلوط نموده تا توکسین اپسیلون فعال شود.

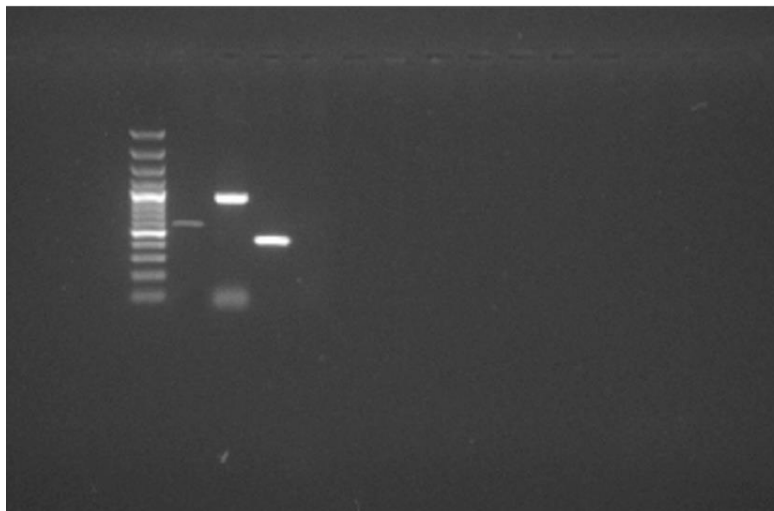
۲- آماده سازی آنتی توکسین استاندارد: آنتی توکسین استاندارد را با سرم فیزیولوژی مخلوط نموده بطوریکه برای اپسیلون محلول ۱ IU/ml بدست آید.

۳- آماده سازی آنتی سرم خرگوش واکسینال و آنتی سرم فیلدی: سرم خرگوشهای واکسینه شده را پس از خونگیری از قلب خرگوش جدا نمایید.

۴- آماده سازی محلولها برای تزریق: نسبت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹، از آنتی توکسین استاندارد را با ۱ میلی لیتر از توکسین ۰/۹، ۰/۷، ۰/۵، ۰/۳ و ۰/۱ سرم فیزیولوژی مخلوط نموده همین عمل برای آنتی سرم فیلدی و آنتی سرم واکسینال انجام شد. سپس محتویات

سرم واکسینال و آنتی سرم فیلدی ۵ واحد بین الملل در میلی لیتر محاسبه گردید.

استاندارد اپسیلون یک موش و در رقت ۰/۱ آنتی سرم واکسینال دوماش مردند. (رقت ۰/۲) لذا مقدار آنتی



تصویر ۱: اولین چاهک مربوط به ladder، دومین چاهک توکسین بتا ۶۱۱ جفت باز، سومین چاهک توکسین آلفا ۹۰۰ جفت باز، چهارمین چاهک توکسین اپسیلون ۴۰۲ جفت باز، پنجمین چاهک کنترل منفی

جدول شماره ۱: پرایمرهای اولیگونوکلئوتید استفاده شده، سکانس پرایمر و طول محصول PCR

References	Amplicone	Sequence (5'-3')	Primers	Toxin Gene
Bauma et al (۲۰۰۴)	۹۰۰	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCTGGGTTGTCCATTTC	CPASL CPASR	Cpa
Bauma et al (۲۰۰۴)	۶۱۱	TCCTTCTTGAGGGAGGATAAA TGAACCTCCTATTTGTATCCCA	CPBL CPBR	Cpb
Songer and Meer ۱۹۹۶	۴۰۲	5-TAC TCA TAC TGT GGG AAC TTC GAT ACA AGC-3 CTCATCTCCATAACTGCACTATAATT TCC-3	ETXII-F ETXII-R	EtX

جدول شماره ۲: MLD سویه‌های فیلدی و واکسینال کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D

سویه	میزان سویه	نتیجه	۱/۸۰۰۰	۱/۶۰۰۰	۱/۴۰۰۰	۱/۲۰۰۰	۱/۱۰۰۰	۱/۱۰۰	۱/۱۰	رقت سویه
نیوزلند	1170ng	۱/۱۵۰۰						++	++	۴۶۸
انستیتو پاستور	1170ng	۱/۱۵۰۰						++	++	۴۶۰
آفریقای جنوبی	3120ng	۱/۴۰۰۰			+	++	++	++	++	۴۵۸
خرم آباد	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۳۱
ساوه	1170ng	۱/۱۵۰۰						++	++	۴۳۲
سیرجان	1170ng	۱/۱۵۰۰						++	++	۴۳۳
کرمان	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۶۹
هشتگرد	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۷۱
هشتگرد	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۴۴
خرم آباد	780ng	۱/۱۰۰۰						+	++	۴۴۷
تبریز	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۱۳/۲
خرم آباد	1170ng	۱/۱۵۰۰						++	++	۴۵۳
خرم آباد	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۵۶
هشتگرد	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۴۰
کرمانشاه	390ng	۱/۵۰۰						++	++	۴۵۰
واکسینال	۳۱۲۰ng	۱/۴۰۰۰			+	++	++	++	++	واکسینال

## بحث و نتیجه گیری

کلستریدیومها به دلیل ایجاد اسپور از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند. زیرا اسپور آن‌ها می‌تواند از طریق خوراک دام و یا تماس با زخم باز باعث بیماری‌زایی گردد. کلستریدیوم پرفرینجنز که عامل بیماری آنتریت و توکسمی می‌باشد یک باسیل گرم مثبت بی‌هوازی بوده که باعث همه‌گیری می‌شود. توکسینهای اپسیلون و بتا از فاکتورهای ویرولانس هستند. به منظور مقابله با عفونت ناشی از این باکتری واکسیناسیون به موقع ضروری است که برای تولید آن باکتری‌ها در محیط‌های کشت مخصوص تکثیر و توکسین‌های خود را به محیط کشت ترشح می‌کنند و سپس توکسین به توکسوئید تبدیل و پس از فرمولاسیون واکسن بدست می‌آید (۱۳). واکسن‌های رایج به صورت مخلوطی از تعدادی باکترین یا توکسوئید یا مخلوط چند باکترین و توکسوئید است (۸). در ایران واکسن چهار ظرفیتی آنتریت و توکسمی توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تولید می‌شود. وجود کلستریدیومها در نقاط مختلف جهان متفاوت می‌باشد. به عنوان نمونه کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B در قاره آمریکای شمالی یافت نشده است (۲۰). در حالیکه در انگلستان و آفریقای جنوبی عامل اسهال خونی در بره می‌باشد که ضرر و زیان سنگینی را به بار می‌آورد (۲۰) و (۱۱). در مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ در منطق ساحل شمالی ایران صورت گرفته سویه‌های تیپ A، B، E کلستریدیوم بوتولینوم گزارش شده است (۲۱). تحقیقات انجام شده در روی سویه‌های جدا شده باکتری کلستریدیوم پرفرینجنز در ایران ثابت کرده است که تیپ B این باکتری عامل اسهال عفونی بره‌های نوزاد و عامل آنتریت هموراژیک در گوسفندهای بالغ و بزغاله است که تحت عنوان تیپ B از ایران گزارش شده است و

Dwight در کتاب میکروبیولوژی به آن اشاره کرده است (۹). تفاوت دو تیپ در ترشح بعضی از توکسین‌های فرعی نیز می‌باشد. اکنون در جداول بیماری‌های ناشی از کلستریدیوم پرفرینجنز در انسان و دام که در کتب علمی به چاپ رسیده نام کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ B عامل آنتریت هموراژیک گوسفند ذکر گردیده که با تیپ B کلاسیک تفاوت دارد. با توجه به ترکیبات آنتی ژنیک در ایران این باکتری به عنوان عامل آنتریت و توکسمی در گوسفند و بز مطرح می‌باشد. بنابراین این باکتری یکی از اجزاء واکسن پلی‌والان آنتریت و توکسمی در ایران می‌باشد که در بعضی کشورها مطرح نمی‌باشد. در مطالعه حاضر از تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی و PCR برای شناسایی کلستریدیومها استفاده شد. انواع روش‌های استخراج DNA وجود دارد. در مطالعه احسنی، PCR مستقیم از کلونی (بدون استخراج) پیشنهاد شد زیرا زمان، مراحل و هزینه PCR را کاهش می‌دهد و امکان آزمایش بسیاری از نمونه‌ها را در زمان کوتاه فراهم می‌کند. (۱) توکسین اپسیلون در ۴۰۰ کیلو باز، توکسین آلفا در ۹۰۰ کیلو باز و توکسین بتا در ۶۱۱ کیلو باز و در کنترل منفی باندی دیده نشد. همین نتایج در مطالعه Songer و Meer و جباری نیز مشخص شد (۱۹) و (۱۰). در مطالعه Rood برای تشخیص کلستریدیومها از توکسین‌های اصلی برای تعیین تیپ سویه‌ها و توکسین‌های فرعی برای تعیین زیر تیپ‌ها استفاده شد (۱۸). Sterne تحقیقی در زمینه MLD کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D انجام داد که نتیجه آن از رقت ۱/۱۵ تا ۱/۳۰۰ بود (۱۴). در این بررسی محدوده MLD کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D از رقت ۱/۵۰۰ تا ۱/۴۰۰۰ بود که نسبت به تحقیق مذکور نتیجه مناسبتری را نشان داد (۱۴) و شرایط لازم برای تولید توکسین سویه فیلدی انتخاب

- vaccine in Iran. *Developmental Biology* 32: 31-34.
- 4-ARDEHALI, M., DARAKHSHAN, H., MOOSAWI, M. (1984). THE EXISTENCE AND PRESENT SITUATION OF CLOSTRIDIAL DISEASES OF DOMESTIC ANIMALS IN IRAN. *ARCHIVES OF RAZI INSTITUTE* 34: 27.
- 5- Ardehali, M., Moosawi, M., Pilehchian, R. (1994). Isolation of toxigenic strains of *Clostridium perfringens* from the soil of farms in Iran. *Archives of Razi Institute* 44,45: 95-100.
- 6-Baums, C. G., Schotte, U., Amtsberg, G., Goethe, R. (2004). Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology* 100: 11-16.
- 7-European Pharmacopoeia. *Clostridium perfringens* for veterinary use. 2005. 5<sup>th</sup> edition. 1:744-747.
- 8-European Pharmacopoeia. *Clostridium perfringens Vaccines* for Veterinary use. 2008: 363.
- 9-Ghazi, F., Younan, M., Ardehali, M., Muller, W. (1997). Differentiation of proteinase (minor toxin lambda) in *Clostridium perfringens* strains from sheep and goats in Iran. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 104: 443-445.
- 10-Jabbari, A. R., Afshari Far, S., Esmaelizad, M., Pilehchian Langroudi, R., Moosawi Shoostari, M., Abdolmohammadi Khiav, L. (2011). Molecular typing of toxigenic *Clostridium perfringens* isolated from sheep in Iran. *Archives of Razi Institute* 66: 81-86.
- 11- JANSEN, B. C., CLARK, R., LOUW, J. G., DE KOCK, V. E., ALEXANDER, R. A. (1961). THE BETA TOXIN OF *CLOSTRIDIUM WELCHII* TYPE B, WILSDON, IN RELATION TO THE PRODUCTION OF A VACCINE AGAINST LAMB DYSENTERY. ONDERSTEEPOORT. *JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH* 28: 495-549.
- 12-Kaveh, M. (1957). *Journal of Veterinary Medicine* 3: 1-8.
- 13-Nijland, R., Lindner, C., Hartkamp, M., Hamoen, L. W., Kuipers, O. P. (2007). Heterologous production and secretion

شده برابر با سویه واکسینال بود که با استاندارد بین المللی EP نیز مطابقت دارد. البته لازم است تا آزمایشات تکمیلی دیگری انجام شود تا در صورت اطمینان از حصول سایر شرایط بتوان بعنوان کاندید در فرایند تولید یک واکسن آزمایشی مورد استفاده قرار گیرد.

### پیشنهادات

۱- مطالعات تکمیلی در جهت جدا سازی سویه های جدید فیلدی و غربالگری توکسین زایی در بین آنها به منظور یافتن سویه های قویتر از نظر تولید توکسین انجام شود.

۲- مطالعات تکمیلی در زمینه اثرات محیطها و غنی کننده ها مانند تریس ویتامین و تریس المنت بر توکسین زایی سویه های انتخاب شده انجام شود.

۳- تحقیقات در زمینه ایجاد سویه های نو ترکیب (Recombinant) که دارای توان مطلوب در بیان توکسینهای اپسیلون و بتا باشند، انجام گیرد.

### تقدیر و تشکر:

بخشی از هزینه های این پژوهش در قالب طرح شماره ۲۲-۸۶-۱۸-۱۸-۲ و توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تأمین گردیده است. از همکاران بخش تحقیق و تولید واکسن های بی هوازی موسسه رازی بواسطه مساعدت در انجام این مطالعه تشکر می شود.

### منابع

- 1-Ahsani, M. R., Shamsaddini, B. M. (2013). Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in *Clostridium perfringens* typing. *Scientific-Research Iranian Veterinary Journal* 8: 5-12.
- 2-Ardehali, M. (1969). Some observations on *Clostridium perfringens* strains isolated in Iran. *Archives of Razi Institute* 21: 60 – 66.
- 3-Ardehali, M., Darakhshan, H. (1976). Production and standardization of *Clostridium perfringens* polyvalent

- of *Clostridium perfringens* beta-toxoid in closely related Gram-positive hosts. *Journal of Biotechnology* **127**: 361-372.
- 14-Nillo, L. (1980). *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. *The Canadian Veterinary Journal* **21**: 141-148.
- 15- PilehchianLangroudi, R., Aghaei Pour, K., Shamsara, M., Ghorashi, S. A. (2012). In silico fusion of epsilon and beta toxin genes of *Clostridium perfringens* types D and B. *Iranian Journal of Biotechnology* **10**: 54-60.
- 16-Pilehchian Langroudi, R., Aghaei Pour, K., Shamsara, M., Jabbari, A. R., Habibi, G. R., Goudarzi, H., et al. (2011). Fusion of *Clostridium perfringens* type D and B epsilon and beta toxin genes and its cloning in *E. coli*. *Archives of RaziInstitute* **66**: 1-10.
- 17-Rafiyi, A., Ardehali. M. (1961). Diseases of animals caused by *Clostridium welchii*. *Bulletin - Office International Des Epizooties* **55**: 5-6.
- 18-Rood, JI., Cole, ST. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiological reviews* **55**: 621-648.
- 19-Songer, J. G., Meer, R. R. (1996). Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of *Clostridial* enteric disease in animals. *Anaerobe* **2**: 197-203
- 20-Sterne, M., Batty, I. (1975). Pathogenic Clostridia. Butterworth & Co. London.
- 21-TAVAKOLI, HR., RAZAVILAR, V. (2003). ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM BOTIULINUM* (TYPES A, B, E) IN SEDIMENTS FROM COASTAL AREAS IN THE NORTH OF IRAN. *IRANIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH* **32**: 37-40.



## **Molecular identification and evaluation toxin production of *Clostridium perfringens* type D strains isolated cases of the enterotoxaemia in the Razi Institute**

**AbdolmohammadiKhiav, L.<sup>1</sup>, Jabbari, A.R.<sup>\*2</sup>, PilehchianLangroodi, R.<sup>2</sup>**

1. Master of Microbiology Department of Anaerobic Bacterial Vaccines Production, Razi Vaccine and Serum Institute, Agricultural Research and Education Research Organization, Karaj, Iran

2. Associate Professor Department of Anaerobic Bacterial Vaccines Production, Razi Vaccine and Serum Institute, Agricultural Research and Education Research Organization, Karaj, Iran

Received Date: 7 January 2015

Accepted Date: 15 November 2017

---

**Abstract:** *Clostridium perfringens* is cause of enterotoxaemia disease in sheep. The purpose of this research was to select the best strain *Clostridium perfringens* type D isolated from Iran and their comparison with vaccinal strain by MLD and potency tests. In this research 15 strains *Clostridium perfringens* type D were studied. At first, microbiological and biochemical tests were done then specimens were confirmed by PCR test. Finally, the best strain was selected by MLD test and the enterotoxaemia vaccine was prepared by the selected and the vaccine strain separately. The vaccines were kept for 45 days at refrigerator then potency test was done according to standard protocols. The results showed that the conditions for epsilon toxin production by isolated strain and the vaccine strain was nearly similar.

**Keywords:** *Clostridium perfringens*, PCR, MLD, potency, Tetravalent vaccine

---

\*Corresponding author: Jabbari, A.R.

Address Department of Anaerobic Bacterial Vaccines Production, Razi Vaccine and Serum Institute, Agricultural Research and Education Research Organization, Karaj, Iran. Tel: +982634570038

Email: a.jabbari@rvsri.ac.ir