مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره دوم (پیاپی ۲۷) تابستان ۱۳۹۵
صفحات ۱۷۵-۱۶۹

Short Communication

ژنوتایپینگ *کلستریدیوم پرفرنجنس* جدا شده از مناطق سردسیر استان کرمان

بابک خیرخواه*[۱]، مریم حاتم جهرمی[۲]

[۱] استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، [۲] کارشناس ارشد، گروه میکروب شناسی، علوم و تحقیقات سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان.

چکیده

کلستریدیوم پرفرنجنس یک باکتری بی هوازی، گرم مثبت، تولید کننده سم و عامل بیماری انتروتوکسمی در دام ها است. خاک به عنوان مخزن اسپور این باکتری مطرح می باشد. این مطالعه با هدف ژنوتایپینگ *کلستریدیوم پرفرنجنس* جدا شده از روده گوسفندان مبتلا به آنتروتوکسمی و خاک مناطق سردسیر استان کرمان با روش Multiplex PCR انجام شد. این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۵۰ نمونه خاک و ۵۰ نمونه روده دام جمع آوری شده از سه شهرستان سردسیر استان کرمان به منظور جداسازی جدایه های *کلستریدیوم پرفرنجنس* انجام شد. پس از غنی سازی نمونه ها و کشت در محیط اختصاصی و انجام آزمون های تاییدی با استفاده از ازمون های بیوشیمیایی سویه های احتمالی *کلستریدیوم* شناسایی گردید. سپس ژنوتایپینگ سویه های کلستریدیوم *پرفرینجنس* با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز چندگانه انجام شد. از مجموع نمونه های مورد پژوهش، ۴۲ جدایه *کلستریدیوم* شناسایی شدند که ۲۷ مورد آن مربوط به محتویات روده دام بود. همچنین از ۱۰ نمونه خاک آلوده به *کلستریدیوم* در ۵ نمونه *کلستریدیوم پرفرینجنس* تایید گردید. ژنوتایپ های D و A به ترتیب با فراوانی ۵۲ و ۳۰ درصد به ترتیب فراوان ترین ژنوتایپ های شناسایی شده از روده و خاک بودند. پژوهش حاضر نشان داد که *کلستریدیوم پرفرینجنس* شایع ترین گونه جدا شده در بین سایر گونه ها در گوسفندان مبتلا و خاک است. همچنین تایپ D نسبت به سایر تایپ ها از شیوع بیشتری برخوردار بود.

واژگان کلیدی: *کلستریدیوم پرفرینجنس*، آنتروتوکسمی، واکنش زنجیره ای پلی مراز چندگانه.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۴

مقدمه

کلستریدیوم پرفرینجنس (*Clostridium perfringens*) باکتری میله ای، گرم مثبت، اسپورزا، بی حرکت و بی هوازی است که باعث بیماری در انسان و دام می شود (۱). این باکتری در همه جا حضور دارد. به طوری که می تواند از خاک، فاضلاب و دستگاه گوارش پستانداران جدا شود (۲).

کلستریدیوم پرفرینجنس تعداد زیادی سم تولید می کند که مسئول حدت آن است. این باکتری بر اساس بیشترین میزان تولید هر یک از سموم به پنج تایپ A تا E طبقه بندی می گردد. این سموم از جنس پروتئین بوده و اگزوتوکسین هستند (۳). مطالعات اخیر نشان داده است که ۱۷ نوع سم توسط این باکتری ترشح می شود که چهار نوع آنها سموم اصلی می باشند (٤). تمام پنج تایپ این باکتری برای انسان و دام بیماریزا هستند و با اثر بر روی سیستم عصبی آن را از کار انداخته و باعث مرگ می شوند. *کلستریدیوم پرفرینجنس* تایپ A در خاک مناطق آلوده وجود دارد و در روده حیوانات سالم یافت نمی شود.

تایپ C عامل بیماری استراک (Struck) و آنتریت نکروتیک در توله های خوک، بره ها، گوساله ها و انسان است. تایپ D عامل آنتروتوکسی یا قلوه نرمی در بره ها و گوسفندها

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۳۳٤٥٤٧٨٧ پست الکترونیک: babakkheirkhah@yahoo.com

می باشد. تایپ E نیز عامل انتریت توام با خونریزی در گوساله ها بوده و با وجود نادر بودن در استرالیا گزارش شده است (۵).

آنترو توکسمی یکی از شایع ترین بیماری های گوسفندی در دنیا می باشد (۵). این بیماری در ایران نیز بسیار کشنده است و موجب خسارت های اقتصادی می شود. در صورت وجود یک برنامه واکسیناسیون مناسب در برابر آنتروتوکسمی برای گله ها مصونیت کافی در برابر هر نوع *کلستریدیوم پرفرنجنس* تایپ D و C می تواند ایجاد گردد (٦ و ٧). مطالعات نشان داده است که Multiplex PCR روشی بسیار ساده، حساس، اختصاصی و کوتاه برای شناسایی *کلستریدیوم پرفرینجنس* و تعیین تایپ های A تا D این باکتری می باشد (٨).

هدف از این پژوهش ژنوتایپینگ *کلستریدیوم پرفرینجنس* تولید کننده سم جدا شده از روده گوسفندان مبتلا به آنتروتوکسمی و خاک مناطق سردسیر استان کرمان با روش Multiplex PCR بـــــود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: در این مطالعه توصیفی تعداد ۵۰ نمونه خاک از قسمت های سطحی در شهرستان های بافت، سیرجان و کرمان جمع آوری گردید. نمونه ها در کیسه های پلاستیکی استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. تعداد ۵۰ نمونه روده حیوان مبتلا به آنتروتوکسمی از ناحیه آسیب دیده توسط قیچی استریل بریده شد و در ظروف پلاستیکی استریل در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

ب) جداسازی باکتری: در کشت مستقیم از نمونه های خاک و محتویات روده حیوان مبتلا به آنتروتوکسمی رقت سازی تدریجی انجام شد. پس از رقیق سازی عمل کشت سطحی بر روی محیط SPS (Sulfite polymyxin sulfadiazine) (های مدیا، هند) انجام گرفت. مقدار یک گرم از نمونه های روده و خاک به محیط حاوی گوشت پخته (Cooked meat) اضافه شد. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۲٤ ساعت در مورد تمامی نمونه ها انجام گرفت. در نهایت از لحاظ رشد (کدورت و تولید گاز) مورد بررسی قرارگرفتند. از لوله های دارای علایم رشد کشت خطی در سطح محیط جامد SPS صورت گرفت. گرمخانه گذاری نمونه ها در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۲٤ ساعت انجام شد.

کلنی های مشکوک برای انجام آزمون های تاییدی و وجود *کلستریدیوم پرفرینجنس* انتخاب و در سطح محیط SPS دیگر عمل خالص سازی انجام گرفت. کلنی های انتخاب شده مشکوک به *کلستریدیوم پرفرینجنس* (سیاه رنگ) در محیط مایع به طور جداگانه تلقیح و در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس ۵ قطره از محیط یاد شده به محیط کشت لاکتوز سولفید تلقیح و گرمخانه گذاری در شرایط بی هوازی در ۳۷ درجه سلیسیوس به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت انجام گرفت. لوله ها از نظر تولید گاز و رنگ سیاه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از آن در محیط کشت SIM و نیترات تلقیح به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در شرایط بی هوازی گرمخانه گذاشته شدند. لوله ها از لحاظ حرکت (رشد باکتری در اطراف خط تلقیح) و احیای نیترات به نیتریت بعد از افزودن معرف نیتریت ارزیابی شدند.

ج) استخراج DNA برای این منظور از روش جوشاندن استفاده شد. در ابتدا مقداری از کلنی های باکتری برداشته شد و به درون میکروتیوب حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت انتقال داده شد. در ادامه به مدت ۲۰ دقیقه در۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس روماند خارج و رسوب حاصل با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید. مخلوط یاد شده در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف یخ نگهداری و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ در دمای ٤ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید. روماند حاوی DNA بوده و تا انجام مراحل PCR در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری گردید (۹).

د) واکنش زنجیره ای پلی مراز چندگانه: در این پژوهش به منظور تکثیر قطعه ای از ژن های کد کننده سم شامل *cpb, plc*

etx, و *iap* از آغازگرهای اختصاصی آنها استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR با شرایط دمایی ٦ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۳ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز و به کمک دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه به منظور کنترل منفی از آب مقطر استریل و برای کنترل مثبت از سویه مرجع کلستریدیوم *پرفرینجنس* NCTC 14234 استفاده گردید.

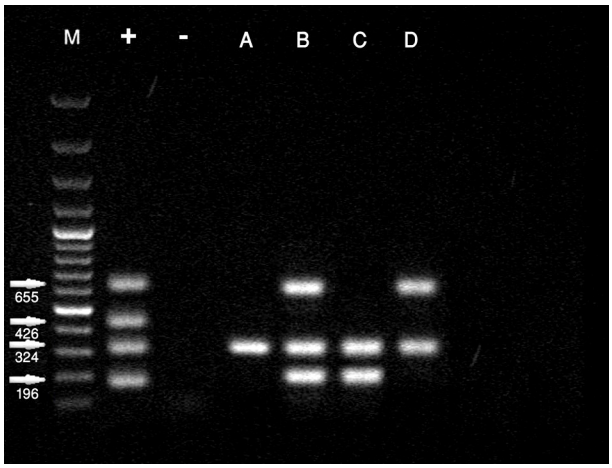
جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

نوع سم	ژن	توالی آغازگر '3'----5'	طول قطعه (جفت باز)
آلفا	*plc (cpa)*	F: GCTAATGTTACTGCCGTTGA R: CCTCTGATACATCGTGTAAG	۳۲٤
بتا	*cpb*	F: GCGAATATGCTGAATCATCTA R: GCAGGAACATTAGTATATCTTC	۱۹٦
اپسیلون	*etx*	F: GCGGTGATATCCATCTATTC R: CCACTTACTTGTCCTACTAAC	٦٥٥
یوتا	*iap*	F: ACTACTCTTCAGACAAGACAG R: CTTTCCTTCTATTACTATACG	٤۲٦

یافته ها

در این مطالعه از ۵۰ نمونه محتویات روده دام های مشکوک به انتروتوکسمی تعداد ٤۲ سویه *کلستریدیوم* جداسازی گردید. اما از ۵۰ نمونه خاک، تنها ۱۰ مورد آلوده به *کلستریدیوم* بودند.

با استفاده از روش PCR مشخص گردید که از ٤۲ جدایه *کلستریدیوم* جدا شده از محتویات روده دام ها، ۲۷ جدایه به عنوان *کلستریدیوم پرفرینجنس* شناخته شدند. همچنین از ۱۰ نمونه خاک آلوده به *کلستریدیوم* در ۵ نمونه *کلستریدیوم پرفرینجنس* تایید گردید. نتایج ژنوتایپینگ نشان داد که تایپ D با فراوانی ۵۲ درصد در محتویات روده تایپ غالب می باشد. از طرفی تایپ A (۳۰ درصد) در نمونه خاک نیز بالاترین فراوانی را دارا بود (شکل ۱ و جدول ۲).



شکل ۱: نتایج الکتروفورز محصول PCR تایپ های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، +) کنترل مثبت، -) کنترل منفی، ستون های A تا D) نتایج Multiplex PCR.

بحث

کلستریدیوم پرفرینجنس یک عامل مهم بیماری روده ای در انسان ها و حیوانات خانگی است. این باکتری توکسین های مختلفی تولید می کند که نقش های کلیدی در بیماری زایی این باکتری ایفا می کند. *کلستریدیوم پرفرینجنس* به ۵ تایپ زیستی A تا E تقسیم می شود. این تقسیم بندی بر اساس محصولات مختلف توکسین های آلفا (α)، بتا (β)، اپسیلون (ε) و یوتا (ί) است. توکسین α توسط همه تایپ ها تولید می شود (۱۰ و ۱۱). همچنین β توکسین توسط سویه های تایپ های B و C تولید می شود. توکسین ε توسط سویه های تایپ B و D و توکسین ί توسط سویه های تایپ E تولید می شود.

این توکسین ها به عنوان سموم اصلی تولید شده توسط *کلستریدیوم پرفرینجنس* شناخته می شوند. بیوتایپ های مختلف *کلستریدیوم پرفرینجنس* با بیماری های مختلفی در

جدول ۲: فراوانی نمونه ها بر اساس نتایج PCR ژن های تولید کننده سم.

انواع تایپ ها	محتویات روده		خاک	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
تایپ **A**	۱	۲	۳	۳۰
تایپ **B**	٤	۱۰	۱	۱۰
تایپ **C**	–	–	–	–
تایپ **D**	۲۲	۵۲	۱	۱۰
نمونه منفی	۱۵	۳٦	۵	۵۰
جمع	**٤۲**	۱۰۰	۱۰	۱۰۰

ارتباط می باشند. به عنوان نمونه، گزارش شده است که تایپ A عامل مسمومیت غذایی در انسان و گاز گانگرن می باشد. توکسین اصلی این تایپ آلفا است. تایپ B عامل زردی بره ها بوده و توکسین اصلی آن بتا توکسین می باشد.

تایپ C موجب انتروتوکسمی هموراژیک–نکروتیک در گوساله، بره، کره اسب، توله خوک و انتریت نکروتیک در جوجه های ۲ تا ۱۲ هفته و بیماری استراک در گوسفندان بالغ شده و توکسین اصلی این تایپ بتا توکسین است. تایپ D عامل انتروتوکسمی در گوسفند است و توکسین اصلی آن اپسیلون می باشد. تایپ E، انتروتوکسمی هموراژیک در گوساله و بره ایجاد می کند و توکسین اصلی آن یوتا است (۱۲).

طول دوره انکوباسیون به طور معمول برای *کلستریدیوم پرفرینجنس* ٤٨ ساعت در نظر گرفته می شود. با نزدیک شدن به انتهای این دوره، باکتری به تدریج وارد مرحله سکون و مرگ می گردد و سیستم های تحدید کننده و اتولیز به حداکثر فعالیت خود می رسند. این سیستم ها به اضافه توکسین بتا (DNase) که از مراحل اول کشت باکتری شروع به ترشح می کند، ژنوم باکتری را در مراحل استخراج DNA مورد تهدید قرار می دهد.

به منظور جلوگیری از ایجاد این موضوع در مطالعه حاضر از کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته باکتری در مرحله لگاریتمی رشد برای استخراج DNA استفاده گردید. دیواره ضخیم سلولی در باکتری های گرم مثبت استخراج DNA ژنومی آن ها مشکل است. به منظور رفع این مشکل، از SDS و لیزوزیم استفاده شد. در مرحله لگاریتمی رشد مقدار RNA به دلیل شرایط تکثیر باکتری و نیاز به تولید پروتئین در حداکثر مقدار است. در این پژوهش RNA پس از انجام مراحل استخراج DNA به صورت یک باند ضعیف بر روی ژل آگاروز با وزن پایین مشاهده گردید و برای حذف آن از آنزیم RNase استفاده شد. برای تکثیر ژن آلفا توکسین از توالی پرایمر موجود و در دسترس این ژن که قبلاً گزارش شده بود استفاده شد. در انجام آزمایش PCR، ابتدا از آنزیم *Taq* DNA Polymerase استفاده شد. پس از بهینه سازی شرایط با آنزیم DNA پلی مراز *Pfu* ادامه کار انجام شد. دلیل استفاده از این آنزیم، توانایی آن در تصحیح اشتباه می باشد. به منظور بهینه سازی شرایط آزمایش PCR میزان نمک MgCl2 هنگام کار با آنزیم *Taq* DNA Polymerase و MgSo4 هنگام کار با آنزیم *Pfu* DNA Polymerase، میزان آنزیم و پرایمر مورد استفاده، تعداد سیکل های دستگاه و دمای اتصال به طور جداگانه ارزیابی گردید و بهترین شرایط برای تکثیر ژن در نظر گرفته شد. پیله چیان (Pilehchian) و همکاران نیز در مطالعه انجام شده بر روی *کلستریدیوم پرفرینجنس* از هر دو آنزیم DNA پلی مراز *Pfu* و PWO استفاده کردند. این محققان نیز نتایج حاصله از هر دو آنزیم را یکسان گزارش کردند (۱۳).

زندی (Zandi) و همکاران با ارزیابی محتویات روده شترمرغ، حضور *کلستریدیوم پرفرینجنس* در ۳٦ درصد از نمونه ها را تایید کردند. این میزان کمتر از فراوانی *کلستریدیوم* در روده گوسفندان پژوهش حاضر است. همچنین در پژوهش احسنی (Ahsani) و همکاران در شهرستان کرمان نشان داده شد که ۳۰ درصد از نمونه های مدفوع گوسفندان آلودگی به *کلستریدیوم* دارد که فراوانی گزارش شده بسیار کمتر از پژوهش حاضر می باشد (١٤).

دلیل این اختلاف می تواند جمع آوری تخصصی نمونه ها از حیوانات مبتلا به عفونت کلستریدیایی باشد. نتایج پژوهش حاضر و مطالعات های یاد شده همگی حاکی از این است که *کلستریدیوم پرفرینجنس* شایع ترین گونه جدا شده در بین سایر گونه ها در شتر مرغ (۱۵) و گوسفندان مبتلا و غیر مبتلا است. مطالعات زیادی عنوان نموده اند که نوع تغذیه و جیره غذایی در فراوانی این باکتری در روده حیوانات نقش دارد (۱۳).

فاکتور تغذیه در پژوهش حاضر به عنوان یک متغییر زمینه ای در نظر گرفته نشد. زیرا این فاکتور در حقیقت از عوامل مستعد کننده دام ها به عفونت است. با توجه به موارد یاد شده پیشنهاد می گردد که در ابتدا تنوع ژنتیکی تایپ های مختلف سایر *کلستریدیوم* ها بررسی شود. سپس با توجه به حساسیت و سرعت عمل بالای PCR با استفاده از این روش در سایر نقاط

کشور مطالعات مولکولی به منظورشناسایی اپیدمیولوژیک باکتری انجام شود. همچنین پیشنهاد می گردد از نتایج حاصل از این پژوهش و سایر پژوهش های مشابه به منظور ساختن واکسن های منطقه ای و موثر استفاده شود و در ساخت واکسن علیه بیماری آنتروتوکسمی تمامی سویه های جدا شده مد نظر قرار گیرد. همچنین انجام مطالعه فیلوژنتیک و مقایسه آن ها با سویه های واکسینال پیشنهاد می گردد.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که *کلستریدیوم پرفرینجنس* شایع ترین گونه جدا شده در بین سایر گونه های *کلستریدیوم* در گوسفندان مبتلا و خاک است. همچنین تایپ D این باکتری نسبت به سایر تایپ ها از شیوع بیشتری برخوردار بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Nagahama M, Mukai M, Morimitsu S, Ochi S, Sakurai J. Role of the C-domain in the biological activities of *Clostridium perfringensa* lpHa-toxin. Microbiol Immunol. 2002; 46(8): 647-655.

2. Shimizu T K, Ohtani H, hirakawa K, Ohshima A, Yamashita T, Shiba n, Ogasawara M, Hattori S, Kuhara and Hayashi H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. Proc Natal AcadSci USA. 2002; 99(5): 996-1001.

3. Ochi S, Oda M, Matsuda H, Ikari S and Sakurai J. *Clostridium perfringens* a lpHa-toxin activates the sphingo myelin metabolism system in sheep erythrocytes. J Biol Chem. 2004; 279 (3): 12181-12189.

4. Pilehchian Langroudi R, Shamsara M, Jabbari AR, Habibi GR, Goudarzi H, Ghorashi SA. Fusion of *Clostridium perfringens* type D and B epsilon and beta toxin genes and it's cloning in *E. coli*. Arch Razi. 2011; 66(1): 1-10.

5. Stevens DL. The pathogenesis of *Clostridial* myonecrosis. Int J Med Microbiol. 2000; 290(3): 497-502.

6. Goke G, Sozmen M, GencO,GokeH. Determination of *Clostridium perfringens* toxin-types in sheep whit suspected entrotoxemia in karsprovince. Turk J Vet Sci.2007; 31(5): 355-360.

7. Kalender H, Kilic A, Atil E. Enterotoxemia in a Cow due to *Clostridium perfringens* type A. Turk J Vet Sci. 2007; 31(1): 83-84.

8. Pilehchian Langroudi R, Aghaiypour K, Shamsara M, Ghorashi S. In silico fusion of epsilon and beta toxin genes of *Clostridium perfringens* type D and B. Iran Biotechnol. 2012; 10(1): 54-60.

9. Keyburn AL, Portela RW, Sproat K, Ford ME, Bannam TL, Yan X, Rood JI, Moore RJ. Vaccination with recombinant net B toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis .Vet Res. 2013; 44(1): 54-59.

10. Coursodon CF, Glock RD, Moor KL, Cooper KK, Songer JG. TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A .Anaerobe. 2012; 18: 117-121.

11. Nagahama M, OhkuboA, OdaM, KobayashiK, AmimotoK, MiamotoK, Sakurai J. *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates subfamily proteins. Infect Immun. 2011; 79(2): 905-910.

12. Jabbari AR, Tekyei F, Esmaelizad M, Pilehchian Langroudi R. Occurrence of Beta 2 toxin genic *Clostridium perfringens* isolates with different toxin in types in Iran. Arch Razi. 2012; 67(2): 133-137.

13. Ahsani M, Shamsadinibafti M. Compare of two methods of direct PCR and PCR with DNA extraction in *Clostridium perfringens* typing. Iran Vet J. 2013; 8(4): 5-12. [In Persian].

14. Poursoltani M, Razmyar J, Mohsenzadeh M, Peighambari M. Isolation and antibiotic susceptibility testing of *Clostridium perfringens* isolated from packaged wing, neck, liver and gizzard of Northeastern of Iran. Iran J Med Microbiol. 2013; 7(1): 35-39.

15. Keyburn AL, YanX X, Bannam TL, VanImmerseel F, Rood JI, Moore RJ. Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. Vet Res. 2010; 41(2): 21-23.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 2, June 2016

Short Communication

Genotypic of *Clostridium perfringens* in cold area of Kerman province

Babak Kheirkhah[1], **Maryam Hatam Jahromi**[2]

[1]Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
[2]MS.c., Department of Microbiology, Sirjan Science and Research branch, Islamic Azad University, Sirja, Iran.

Abstract

Clostridium perfringens is an anaerobic, Gram-positive, toxin-forming bacterium and the etiologic cause of enterotoxaemia in animals. Soil is considered as the main source of spore of this bacteria. This study was aimed to genotyping the *C. perfringens* isolated from intestines of sheep with enterotoxemia and as well as from the soil samples collected from cold area of Kerman province using Multiplex- PCR. This cross-sectional study was carried out on 50 soil samples and 50 intestinal samples collected from three cities located at Kerman to isolate the *C. perfringens* isolates. The *C. perfringens* isolates were identified based on enrichment of the samples and growing up the bacteria in specific media and following performance of confirmation tests using biochemical tests. A PCR reaction were performed to confirm the presence of these strains. Overall 42 Clostridial strains were isolated in this study, among them 27 isolates were collected from intestinal samples. Also, 10 soil samples were contaminated with Clostridia, among them 5 samples belonged to *C. perfringens*. This study showed that *C. perfringens* is the most prevalent species in the sick sheep and soil in comparison to other species. Furthermore, Type D of this species was more prevalent than others.

Keywords: *Clostridium perfringens*, Enterotoxemia, Multiplex-PCR.

Correspondence to: Babak Kheirkhah

Tel: +98 9133454787

E-mail: babakkheirkhah@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(2): 169-175.