



## Evaluating PCR-RFLP Technique in Identifying Genetic Diversity *Clostridium perfringens* Biotype A

Hamid Mosahasankhani<sup>1</sup>, Mehrdad Shamsaddini Bafti<sup>2</sup>, Nadia Kazemipour<sup>3</sup>, Mojtaba Alimolaei<sup>4</sup>, Farokh Rokhbakhsh-Zamin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Graduated from the Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

<sup>2</sup> Department of Research and Production of Biological Products, Kerman Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

<sup>4</sup> Department of Research and Development, Kerman Branch, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran

Received: 9 April 2023, Accepted: 14 June 2023



[10.22059/jvr.2023.352736.3317](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.352736.3317)



[20.1001.1.20082525.1402.78.2.7.1](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.352736.3317)

### Abstract

**BACKGROUND:** *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) is an anaerobic Gram-positive bacillus with spores, whose biotype A is responsible for a variety of diseases, including intestinal inflammation, bloody diarrhea, and gas gangrene, and hemorrhagic bowel syndrome. Genetic variety can explain the bacteria's phenotypic diversity, geographic distribution, host specificity, pathogenicity, antibiotic resistance, and virulence. A molecular method using the pattern of DNA bands classifies bacteria based on the size of fragments produced by enzymatic digestion of the genome.

**OBJECTIVES:** This study aims to standardize the polymerase chain reaction (PCR)- restriction fragment length polymorphism (RFLP) method in identifying the genetic diversity of *C. perfringens* biotype A isolates.

**METHODS:** The genomic DNA of the investigated strains was extracted, and the complete sequence of the alpha toxin gene locus was synthesized using specific primers designed by PCR technique. Enzymatic cleavage of the synthesized amplicons was performed with the Mse I restriction enzyme, and the resulting fragments were separated by electrophoresis and analyzed by ImageJ and NTSYSPC software.

**RESULTS:** The findings showed that the alpha toxin gene locus sequence may change and is not conserved. In this research, 4 different patterns were identified based on enzymatic cleavage. Mutations in this locus can lead to diversity in *C. perfringens* biotype A and the creation of new strains.

**CONCLUSIONS:** The results of this research showed that the alpha toxin gene locus could be considered a DNA molecular marker in *C. perfringens*, and the PCR-RFLP technique can be used as a tool for typing this bacterium and estimating the phylogenetic relationships through comparative studies of nucleotide sequences.

**Keywords:** Alpha Toxin, *Clostridium perfringens*, Genome, Hemorrhagic Bowel Syndrome, Typing

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).  
Publisher: University of Tehran

Corresponding author: Mehrdad Shamsaddini Bafti, Tel/Fax: +9834-32233052-4



### How to cite this article:

Mosahasankhani H, Shamsaddini Bafti M, Kazemipour N, Alimolaei M, Rokhbakhsh-Zamin F. Evaluating PCR-RFLP Technique in Identifying Genetic Diversity *Clostridium perfringens* Biotype A. J Vet Res, 2023; 78(2): 145-156. doi: 10.22059/jvr.2023.352736.3317

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Sequence of Primers Used in Molecular Identification of *Clostridium perfringens* Biotype A.

**Table 2.** Amount of Reagents for PCR Reaction.

**Table 3.** Amount of Reagents for Enzymatic Cleavage of Fragments Synthesized With MseI Enzyme.

**Table 4.** Summary of RFLP Results With ImageJ 1.52v Software as 0 and 1.

**Figure 1.** Results of Agarose Gel Electrophoresis From PCR Technique to Confirm the Presence of *Clostridium perfringens* Biotype A Alpha Toxin Gene.

**Figure 2.** Results of Agarose Gel Electrophoresis From PCR Technique to Synthesis Alpha Gene of *Clostridium perfringens* Biotype A.

**Figure 3.** Results of Agarose Gel Electrophoresis of PCR-RFLP Technique After Enzymatic Cleavage With the Restriction Enzyme Mse I.

**Figure 4.** Comparing the Percentage of DNA Intensity and Bandwidth of Samples at 200 bp by 1.52v ImageJ software.

**Figure 5.** Comparing the Percentage of DNA Intensity and Bandwidth of Samples at 250 bp by 1.52v ImageJ software.

**Figure 6.** Comparing the Percentage of DNA Intensity and Bandwidth of Samples at 350 bp by 1.52v ImageJ software.

**Figure 7.** Comparing the Percentage of DNA Intensity and Band Width of Samples at 400 bp by 1.52v ImageJ Software.

**Figure 8.** Phylogenetic Dendrogram of Samples in RFLP Technique by NTSYSPC Software ver: 2.02.

## ارزیابی تکنیک PCR-RFLP در شناسایی تنوع ژنتیکی کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A

حمید موسی حسنجانی<sup>۱</sup>، مهرداد شمس‌الدینی بافتی<sup>۲</sup>، نادیا کاظمی پور<sup>۳</sup>، مجتبی علی‌ملایی<sup>۴</sup>،  
فرخ رخ‌بخش زمین<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

<sup>۲</sup> بخش تحقیق و تولید فرآورده‌های بیولوژیک، شعبه کرمان، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

<sup>۳</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

<sup>۴</sup> بخش تحقیق و توسعه، شعبه کرمان، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۲۰ فروردین ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۲۴ خرداد ۱۴۰۲

 [10.22059/jvr.2023.352736.3317](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.352736.3317)

 [20.1001.1.20082525.1402.78.2.7.1](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.2.7.1)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** کلستریدیوم پرفرنجنس باسیل گرم مثبت بی‌هوازی و دارای اسپور است که بیوتایپ A آن مسئول انواع بیماری‌ها از جمله التهاب روده، اسهال خونی و قانقاریای گازی و یکی از عوامل اصلی سندرم خونریزی دهنده روده گاوها می‌باشد. تنوع ژنتیکی می‌تواند بیشترین تنوع فنوتیپی، توزیع جغرافیایی، ویژگی میزبانی، بیماری‌زایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حدت را در باکتری‌ها توضیح دهد. روش مولکولی مبتنی بر الگوی باندهای DNA، باکتری را بر اساس اندازه قطعات تولید شده توسط هضم آنزیمی ژنوم طبقه بندی می‌کند.

**هدف:** استاندارد سازی و کاربرد تکنیک PCR-RFLP در شناسایی تنوع ژنتیکی جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A.

**روش کار:** استخراج DNA ژنومی سویه‌ها و سنتز توالی کامل لوکوس ژنی توکسین آلفا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده با تکنیک PCR انجام شد. برش آنزیمی آمپلیکون‌های سنتز شده با آنزیم محدودالایتر MseI انجام و قطعات حاصل با تکنیک الکتروفورز از یکدیگر تفکیک شدند و توسط نرم افزارهای ImageJ و NTSYSPC مورد بررسی قرار گرفتند.

**نتایج:** یافته‌های به دست آمده نشان داد که توالی لوکوس ژنی توکسین آلفا ممکن است تغییر کند و حفاظت شده نباشد. در مطالعه حاضر چهار الگوی مختلف بر مبنای برش آنزیمی شناسایی شد. جهش در این لوکوس می‌تواند منجر به ایجاد تنوع در کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A و ایجاد سویه‌های جدید شود. **نتیجه‌گیری نهایی:** لوکوس ژنی توکسین آلفا می‌تواند یک نشانگر مولکولی DNA در کلستریدیوم پرفرنجنس محسوب شود و تکنیک PCR-RFLP به عنوان ابزاری برای تایپینگ این باکتری و تخمین میزان روابط فیلوژنتیکی از طریق مطالعات مقایسه‌ای توالی‌های نوکلئوتیدی کاربرد داشته باشد.

**کلمات کلیدی:** تایپینگ، توکسین آلفا، ژنوم، سندرم خونریزی‌دهنده روده، کلستریدیوم پرفرنجنس

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی، دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

**نویسنده مسئول:** مهرداد شمس‌الدینی بافتی، بخش تحقیق و تولید فرآورده‌های بیولوژیک، شعبه کرمان، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

### مقدمه

جنس کلستریدیوم از یک مجموعه ناهمگن بزرگ از باکتری‌های میله‌ای بی‌هوازی سازنده هاگ تشکیل شده است. اگرچه بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش می‌باشند ولی عامل بیماری‌زای فرصت طلب بوده که در محیط، خاک، آب، فاضلاب و دستگاه گوارش حیوانات و انسان یافت می‌شوند (۱). کلستریدیوم پرفرنجنس باعث ایجاد بیماری‌های زیادی در انسان و دام می‌شود. نوع توکسین‌های مترشحه، اساس طبقه‌بندی این باکتری می‌باشد. کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A مسئول انواع بیماری‌ها از جمله عفونت‌های بافت نرم، مسمومیت غذایی، التهاب روده، اسهال خونی و قانقاریای گازی است (۲، ۳). توکسین آلفا توسط تیپ‌های مختلف باکتری کلستریدیوم پرفرنجنس تولید می‌شود و یک لسیتیناز (فسفولیپاز C)

است که گویچه‌های قرمز و سفید، پلاکت‌ها و سلول‌های اندوتلیال را لیز می‌کند. توکسین آلفا یکی از چهار توکسین اصلی مترشحه از کلاستریدیوم پرفرنجنس است که در همه تیپ‌ها وجود دارد و توسط لوکوس ژنی نزدیک نواحی متغیر در داخل کروموزوم بیان می‌شود (۴). توکسین آلفا با استفاده از یک پپتید سیگنال (۲۸ اسید آمینه اول) ترشح می‌شود و نتیجه آن ایجاد یک پروتئین بالغ متشکل از ۳۷۰ آمینو اسید (۴۳ کیلو دالتون) است. توکسین آلفا از دو بخش تشکیل شده است: یک دامنه از مارییج آلفا بنام انتهای N (اسید آمینه‌های ۱-۲۴۶) و یک ساندویچ بتا بنام دامنه انتهای C (اسید آمینه‌های ۲۵۶-۳۷۰)، که توسط یک ناحیه اتصال دهنده کوتاه قابل انعطاف (اسید آمینه‌های ۲۵۵-۲۴۷) به یکدیگر وصل می‌شوند (۵). Shoukat و همکاران در سال ۲۰۱۸ ژن‌های حدت کلاستریدیوم پرفرنجنس را شناسایی کردند و شیوع آن را در گوسفندهای با بیماری اسهال مورد بررسی قرار دادند و فراوانی بیوتایپ A را گزارش کردند (۶). در مطالعه‌ای که توسط Wani و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مورد ژن‌های حدت کلاستریدیوم پرفرنجنس ماهی‌های آب شیرین در هند با تکنیک Multiplex-PCR انجام شد فقط کلاستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A را گزارش نمودند که نشان دهنده اهمیت و فراوانی این بیوتایپ باکتری می‌باشد (۷). در مطالعه Matsuda و همکاران در سال ۲۰۱۹ شیوع و تنوع ژنتیکی توکسین‌های کلاستریدیوم پرفرنجنس را در ۷۹۸ ایزوله بالینی مورد بررسی قرار دادند و به هفت توکسینوتایپ تقسیم بندی کردند و ژن آلفا توکسین را شایع‌ترین توکسین گزارش کردند (۸). تنوع ژنتیکی می‌تواند تنوع فنوتیپی، توزیع جغرافیایی باکتری‌ها، ویژگی‌های میزبان، بیماری‌زایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حدت را توضیح دهد. تعیین بیوتایپ سویه باکتریایی به ویژه برای تشخیص، درمان و نظارت اپیدمیولوژیک مهم است (۹). برای این منظور، می‌توان از مجموعه‌ای از روش‌های ساده فنوتیپی مانند آزمایش بیوشیمی یا تعیین سروتیپ، استفاده از اختلاف در ساختار، فعالیت بیوشیمیایی و آنزیمی یا ترکیب آنتی‌ژنی میکروارگانیسم داده شده استفاده نمود. علاوه بر این، می‌توان از روش‌های پیچیده‌تر ژنوتیپی برای ایجاد تمایز حساس‌تر بین سویه‌ها و داشتن میزان بالاتر افتراق در مقایسه با روش فنوتیپی استفاده کرد. طی دو دهه گذشته روش‌های مولکولی همچون روش‌های مبتنی بر الگوی باندهای DNA (DNA Binding Pattern) جایگزین روش‌های فنوتیپی برای تعیین نوع سویه‌های باکتریایی شده است (۱۰). از شباهت الگوهای تولیدی می‌توان برای تمایز سویه‌ها و تجزیه و تحلیل رابطه ژنتیکی استفاده کرد. تعداد قطعات به دست آمده به فراوانی و توزیع مکان‌های برش به ویژه توسط آنزیم محدودالتر در توالی نوکلئوتیدی کروموزوم باکتریایی بستگی دارد. یکی از روش‌های مبتنی بر الگوی باندهای DNA، تکنیک PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) است. در این تکنیک اندازه قطعات محدود کننده را با الکتروفورز ژل معمولی پس از اثر برش آنزیم محدودالتر که به طور معمول از هم جدا شده‌اند را اندازه می‌گیرد. در تکنیک PCR از آنجایی که پرایمرها به طور اختصاصی عمل می‌کنند، در نتیجه در بین انواع گونه‌های مختلف جانداران می‌توان یک گونه یا سویه خاص را ردیابی نمود. تکنیک RFLP شامل تجزیه و تحلیل آمپلیکون‌های PCR است که با تکثیر توسط آغازگرها برای توالی‌های خاص مورد نظر به دست می‌آید. از این تکنیک برای شناخت چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی SNP (Single Nucleotide Polymorphism) و چند شکلی‌های چند نوکلئوتیدی MNP (Multiple Nucleotide Polymorphism) استفاده می‌شود. این یک روش ارزان قیمت است که نیازی به ابزار پیشرفته ندارد. انتخاب آنزیم‌های محدودالتر می‌تواند دشوار باشد زیرا چندین SNP بر روی همان سایت شناسایی آنزیم محدودالتر می‌تواند وجود داشته باشد که ممکن است منجر به شناسایی تغییرات ژنتیکی شود. تجزیه و تحلیل رایانه‌ای تعداد و اندازه قطعات تولید شده از هر سویه، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک را هم فراهم می‌کند (۱۱-۱۵). هدف از انجام مطالعه حاضر استانداردسازی و توسعه تکنیک PCR-RFLP در شناسایی تنوع ژنتیکی کلاستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A است. در مطالعه حاضر جهت شناسایی تنوع ژنتیکی کلاستریدیوم پرفرنجنس بر اساس روش مولکولی مبتنی بر الگوی باندهای DNA، از تکنیک PCR-RFLP استفاده شد.

## مواد و روش کار

تعداد ۲۱ جدایه بیماری‌زای کلاستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A نگهداری شده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی شعبه جنوب شرق کشور، کرمان (کد اخلاق: IR.RVSRI.REC.1400.003) جهت انجام مطالعه حاضر انتخاب شدند و کشت مجدد در محیط کشت اختصاصی باکتری کلاستریدیوم پرفرنجنس (TSC (Tryptose Sulfit Cycloserin) داده شد. محیط کشت‌ها همراه با اندیکاتور بی‌هوازی درون جار قرار داده شدند و توسط دستگاه آنوکسومت (Mart ساخت کشور هلند) بی‌هوازی گردیدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند. از این تعداد ۱۶ عدد جهت استخراج DNA ژنومی نمونه‌ها با کیت DNA (IR) Cat No: DM05050 ساخت شرکت پیشگامان انتقال ژن ایران انتخاب شد. با هدف تأیید جدایه‌های کلاستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A، واکنش PCR با پرایمر آلفا (جدول ۱) و با استفاده از واکنشگرها (جدول ۲) انجام شد. برنامه دمایی PCR جهت تکثیر ژن آلفا شامل واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل

واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در ۵۲/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه روی DNA نمونه‌ها انجام شد.

از سویه استاندارد کلستریدیوم پرفرنجنس تیپ A (ATCC<sub>13124</sub>) به عنوان کنترل مثبت و سویه کلستریدیوم سپتییکوم (CN<sub>913</sub>) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس محصولات PCR با ولتاژ ۹۰ به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند و پس از رنگ‌آمیزی و با استفاده از ژل داک عکسبرداری از روی ژل انجام شد.

در مرحله بعدی با استفاده از آنزیم PFU DNA Polymerase، واکنش PCR جهت سنتز توالی کامل لوکوس ژنی توکسین آلفا و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی زیر انجام گردید (۱۶-۱۸).

Forward: ccgGAATTCTCATATGTGGGATGGAAAAATTGAT

Reverse: ccgCTCGAGTTTATATTATAAGTTGAATTT

سپس جهت انجام تکنیک RFLP برش آنزیمی آمپلیکون‌های سنتز شده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد با آنزیم محدودالتر MseI (10 U/μL, Thermo Fisher, Cat.: ER0982) بر اساس ترکیبات جدول ۳ انجام شد. میکروتیوپ‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خاتمه برش برای غیر فعال سازی آنزیم از EDTA (Cat.:R1021) ۰/۵ مولار در pH=۸ به مقدار ۱/۴۳ میکرولیتر استفاده شد (۱۹، ۲۰). در مرحله بعدی قطعات برش یافته با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد از هم تفکیک شدند. ارزیابی تصاویر الکتروفورز با نرم افزار ImageJ (1.52v) انجام شد. این نرم افزار، نرم‌افزاری برای پردازش و کمی‌سازی تصاویر می‌باشد و در بسیاری از مسائل پردازش و تحلیل تصاویر به کار می‌رود. در آنالیزهای آماری مطالعه حاضر از نرم افزار (Numerical Taxonomy System personal computer, Ver:2.02) Ntsyspc که یک نرم افزار بسیار قدرتمند جهت انجام چندین آزمون آماری چند متغیره می‌باشد استفاده شد. این روش‌ها بر مبنای تعیین شباهت و یا فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و گروه‌بندی آن‌ها بر مبنای تشابهات با استفاده از روش Neighbor Joining می‌باشد. مهم‌ترین بخش نرم افزار Ntsys تجزیه خوشه‌ای یا Cluster Analysis است. از این نرم افزار جهت رسم دندروگرام فیلوژنتیکی استفاده شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در شناسایی مولکولی کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتاایپ A.

نام ژن	توالی پرایمر (۳' - ۵')	اندازه آمپلیکون (bp)
آلفا	F - GCTAATGTTACTGCCGTTGA R - CCTCTGATACATCGTGTAAG	۳۲۴

جدول ۲. میزان واکنشگرها جهت واکنش PCR.

مواد	حجم (میکرولیتر)
Master mix	۲۵
Forward primer α 10μM	۱/۵
Reverse primer α 10μM	۱/۵
dH <sub>2</sub> O DNA Free	۱۷
DNA sample	۵
حجم نهایی	۵۰

جدول ۳. میزان واکنشگرها جهت برش آنزیمی قطعات سنتز شده با آنزیم MseI.

مواد	حجم (میکرولیتر)
dH <sub>2</sub> O DNA Free	۱۳
PCR Product	۱۵
Buffer R10X	۳
MseI	۱
حجم نهایی	۳۲

جدول ۴. خلاصه نتایج RFLP با نرم افزار ImageJ 1.52v به صورت ۰ و ۱.

نمونه	اندازه باند DNA (pb)			
	۴۰۰	۳۵۰	۲۵۰	۲۰۰
P- Control	۱	۱	۱	۱
N- Control	۰	۰	۰	۰
HK2	۱	۱	۱	۱
HK5	۱	۱	۱	۱
HK6	۱	۱	۰	۱
HK7	۱	۱	۰	۱
HK8	۱	۱	۱	۱
HK9	۱	۱	۱	۱
HK10	۱	۱	۱	۱
HK11	۰	۰	۰	۱
HK12	۱	۱	۱	۱
HK13	۱	۱	۱	۰
HK16	۱	۱	۱	۰
HK17	۱	۱	۱	۰
HK18	۱	۱	۱	۱
HK19	۱	۱	۱	۱
HK20	۱	۱	۱	۱
HK21	۰	۰	۰	۱

## نتایج

ارزیابی بیوتایپ A در آزمایشات باکتری‌شناسی، بیوتایپ A کلاستریدیوم پرفرنجنس را تأیید نمودند. تأیید مولکولی بیوتایپ باکتری نیز با انجام واکنش PCR اختصاصی برای تأیید حضور ژن آلفا (آمپلیکون ۳۲۴ bp) انجام و باکتری تأیید مولکولی گردید (تصویر ۱). لوکوس ژنی آلفا نیز با پرایمرهای اختصاصی سنتز شد. اندازه آمپلیکون سنتز شده ۱۱۳۴ bp می‌باشد که در تصویر ۲ مشخص است.

جهت انجام تکنیک PCR-RFLP با استفاده از آنزیم محدودالایتر Mse1 در لوکوس ژنی توکسین آلفا (*cpa*) برش آنزیمی صورت گرفت. با بررسی باندها از طرف ۳'→۵' تعداد پنج جایگاه برش TTAA ایجاد شد که به ترتیب شش قطعه به طول‌های ۱۶، ۹۲، ۱۷۹، ۲۰۲، ۳۲۵ و ۳۷۷ جفت باز به دست آمد. همچنین از طرف ۵'→۳' هفت جایگاه برش AATT مشاهده شد که به ترتیب هشت قطعه به طول‌های ۱۹، ۲۲، ۷۰، ۸۳، ۹۶، ۱۳۴، ۱۳۹ و ۶۲۹ جفت باز حاصل شد. نتایج الکتروفورز ژل آگارز حاصل از تکنیک PCR-RFLP و موقعیت و کیفیت باندها مشاهده و بررسی گردید (تصویر ۳).

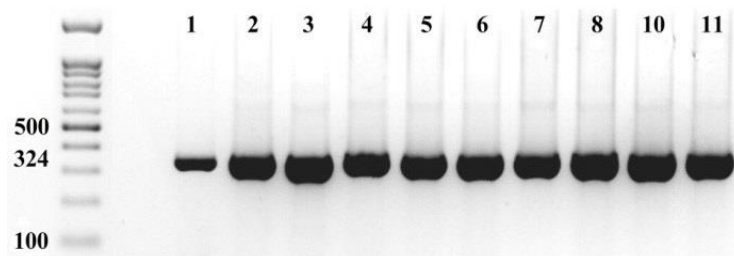
جهت آنالیز از نرم افزار ImageJ استفاده شد و شدت و پهنای باند DNA به صورت درصد مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آنالیز قطعات برش یافته با اندازه‌های ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ جفت باز به ترتیب در تصاویر ۴، ۵، ۶، ۷ به صورت نمودار ستونی آورده شده است. خلاصه نتایج RFLP با نرم افزار ImageJ به صورت ۰ و ۱ در جدول ۴ نمایش داده شده است. اگر درصد شدت و پهنای باند DNA در اندازه‌های ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ جفت باز بیش از ۳ درصد باشد به صورت عدد یک و کمتر از ۳ درصد به صورت صفر در نظر گرفته شد و این اعداد در نرم افزار Ntyspc به عنوان داده وارد شد و مورد پردازش قرار گرفت.

در مطالعه حاضر تشابه نمونه‌ها با یکدیگر و با کنترل‌های مثبت و منفی با نرم افزار Ntyspc بررسی گردید و بر مبنای آن دندروگرام فیلوژنتیکی رسم گردید (تصویر ۸). در این دندروگرام چهار گروه از همدیگر به شرح زیر متمایز شدند:

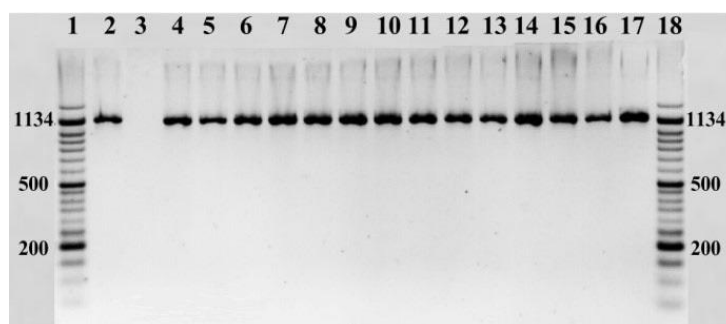
گروه اول شامل نمونه‌های HK2، HK5، HK9، HK10، HK18، HK19 و HK20 می‌باشند که شباهت و قرابت ژنتیکی بیشتری با سویه کنترل مثبت دارند. گروه دوم شامل نمونه‌های HK6، HK7، HK13، HK16، HK17 و HK18 می‌باشند که شباهت و قرابت ژنتیکی کمتری با سویه کنترل مثبت داشتند. گروه سوم شامل نمونه‌های HK11 و HK21 می‌باشند که با سویه کنترل مثبت از نظر ژنتیکی



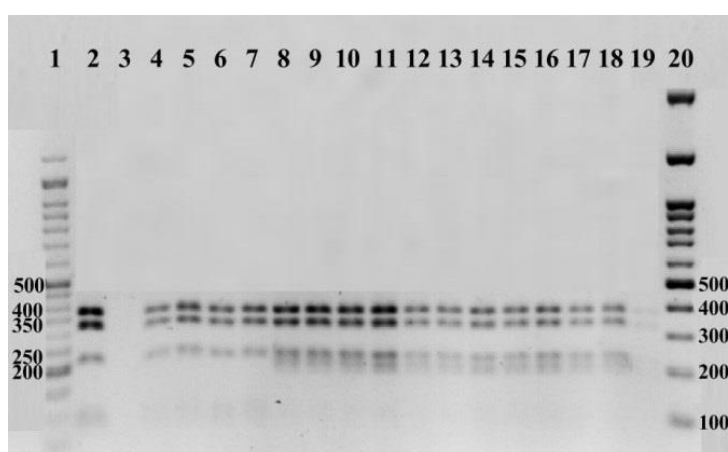
اختلاف داشتند. گروه چهارم شامل نمونه‌های HK8 و HK12 که شباهت و قرابت ژنتیکی بسیار به هم داشتند و در یک گروه قرار گرفتند.



**تصویر ۱.** نتایج الکتروفورز ژل آگارز حاصل از تکنیک PCR جهت تأیید حضور ژن آلفا توکسین کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (M: نشانگر مولکولی استاندارد ۱۰۰ bp، شرکت سینا کلون، ایران (Cat. No: SL7041)، چاهک ۱: سویه استاندارد کلستریدیوم سپتیکوم (CN<sub>913</sub>) به عنوان کنترل منفی، چاهک ۲: سویه استاندارد کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (ATCC<sub>13124</sub>) به عنوان کنترل مثبت، چاهک‌های ۳ تا ۱۱: به ترتیب نمونه‌های HK2، HK5، HK6، HK7، HK8، HK9، HK10، HK12 و HK20.



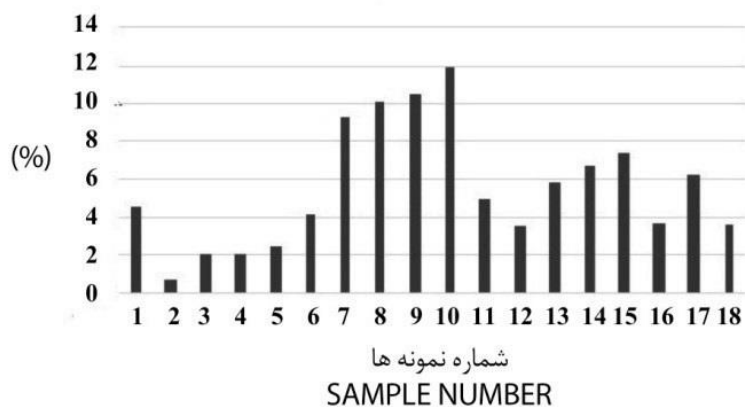
**تصویر ۲.** نتایج الکتروفورز ژل آگارز حاصل از تکنیک PCR جهت سنتز سنتر لوکوس ژنی آلفا کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (چاهک‌های ۱ و ۱۸: نشانگر مولکولی استاندارد ۵۰ bp، شرکت سینا کلون، ایران (Cat. No: SL7021)، چاهک ۲: سویه استاندارد کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (ATCC<sub>13124</sub>) به عنوان کنترل مثبت، چاهک ۳: سویه کلستریدیوم سپتیکوم (CN<sub>913</sub>) به عنوان کنترل منفی، چاهک‌های ۴ تا ۱۷: به ترتیب نمونه‌های HK2، HK5، HK6، HK7، HK8، HK9، HK10، HK11، HK12، HK13، HK16، HK17 و HK20.



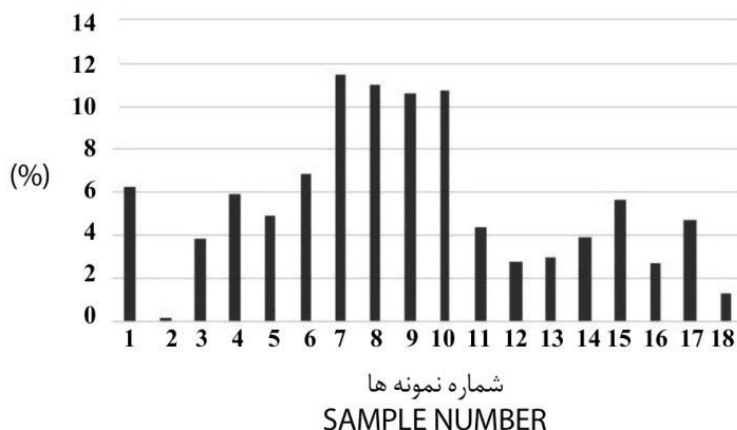
**تصویر ۳.** نتایج الکتروفورز ژل آگارز حاصل از تکنیک PCR-RFLP پس از برش آنزیمی با آنزیم محدودالایر MseI (چاهک ۱: نشانگر مولکولی استاندارد ۵۰ bp، شرکت سینا کلون، ایران (Cat.No: SL7021)، چاهک ۲: کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (ATCC<sub>13124</sub>) به عنوان کنترل مثبت، چاهک ۳: کلستریدیوم سپتیکوم (CN<sub>913</sub>) به عنوان کنترل منفی، چاهک‌های ۴ تا ۱۹: به ترتیب نمونه‌های HK13، HK16، HK17، HK18، HK19، HK20، HK2، HK9، HK5، HK6، HK7، HK8، HK10، HK11، HK12 و HK21، چاهک ۲۰: نشانگر مولکولی استاندارد ۱۰۰ bp، شرکت سینا کلون، ایران (Cat.No: (SL7041)).

بحث

توکسین آلفا دارای دو دامنه و یک ناحیه اتصال دهنده است، دامنه انتهایی N مسئول فعالیت فسفولیپاز C و دامنه انتهایی C که در اتصال و وارد کردن توکسین به غشای سلولی برای فعالیت همولیتیک نقش دارد. جهش در هر نقطه از توالی ژنوم اثرات متفاوتی خواهد داشت زیرا توکسین آلفا به دلیل دارا بودن متالوآنزیم فسفولیپاز C دارای فعالیت‌های کشنده است و فعالیت‌های اسفنگومیلیناز، که باعث هیدرولیز فسفولیپیدها و اسفنگومیلین می‌شود منجر به آسیب بافتی و لیز سلول‌های خونی و سلول‌های اپیتلیال می‌شود (۲۱). Li و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثبات کردند که الگوهای RFLP عمدتاً ترکیب خاص آنزیم‌های برشی و پروب‌های اسید نوکلئیک می‌باشند و در تجزیه و تحلیل RFLP در باکتری شناسی، اگر دو سویه دارای فاصله متفاوت بین محل‌های برش برای یک آنزیم برشی خاص باشند، طول آن قطعات محدود کننده بین سویه‌ها متفاوت خواهد بود. این شباهت الگوهای تولید شده از قطعات محدود کننده می‌تواند برای تمایز سویه‌ها و تجزیه و تحلیل ژنتیکی استفاده شود (۲۲).



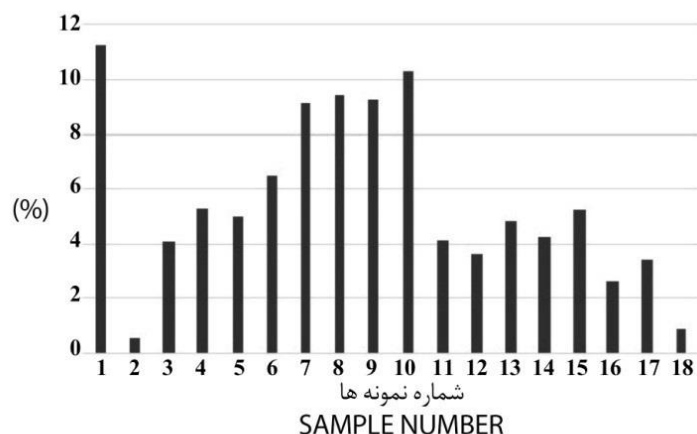
**تصویر ۴.** نمودار مقایسه درصد شدت و پهنای باندهای DNA نمونه‌ها در ۲۰۰ bp توسط نرم افزار ImageJ 1.52v (ستون ۱: سویه استاندارد کستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (ATCC 13124) به عنوان کنترل مثبت، ستون ۲: سویه کستریدیوم سپتیکوم (CN913) به عنوان کنترل منفی، ستون‌های ۳ تا ۱۸: به ترتیب نمونه‌های HK21 و HK10, HK11, HK12, HK8, HK7, HK6, HK5, HK9, HK2, HK20, HK19, HK18, HK17, HK16, HK13.



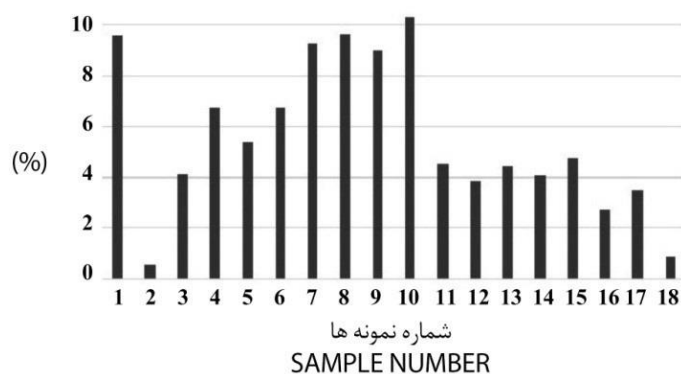
**تصویر ۵.** نمودار مقایسه درصد شدت و پهنای باندهای DNA نمونه‌ها در ۲۵۰ bp توسط نرم افزار ImageJ 1.52v (ستون ۱: سویه استاندارد کستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (ATCC 13124) به عنوان کنترل مثبت، ستون ۲: سویه کستریدیوم سپتیکوم (CN913) به عنوان کنترل منفی، ستون‌های ۳ تا ۱۸: به ترتیب نمونه‌های HK21 و HK10, HK11, HK12, HK8, HK7, HK6, HK5, HK9, HK2, HK20, HK19, HK18, HK17, HK16, HK13.

بر این اساس، دو مجموعه اطلاعات برای PCR-RFLP، یعنی آغازگرهای واکنش PCR و آنزیم‌های محدود کننده برای RFLP اهمیت دارد و احتمال خطا کم است (۲۳). اگر مولکول‌های متفاوت در نوکلئوتیدهای توالی ژنی یا SNPها باشد، قطعات مختلف ممکن

است ایجاد شود. قطعات را می‌توان با ژل الکتروفورز جدا کرد و عکس برداری نمود. تنوعات ژنتیکی مشاهده شده پس از برش آنزیمی با آنزیم محدودالایتر *Mse1* الگوهای مختلفی را در لوکوس ژنی توکسین آلفا نشان داد و می‌توان از آن‌ها پس از آنالیز برای شناسایی تنوع ژنتیکی استفاده نمود. این لوکوس ژنی در همه سویه‌ها وجود دارد و در واقع می‌توان به عنوان یک نشانگر مولکولی DNA استفاده شود. با کمک این نشانگرها، شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و کیفی امکان پذیر شده است. از آنجا که لوکوس ژنی توکسین آلفا یک نشانگر مولکولی DNA در کستریدیوم پرفرنجنس محسوب می‌شود و به همین علت تکنیک PCR-RFLP روش ساده‌ای برای تخمین میزان روابط فیلوژنتیکی و تکاملی جایگزینی بازها از طریق مطالعات مقایسه‌ای توالی‌های نوکلئوتیدی می‌باشد.

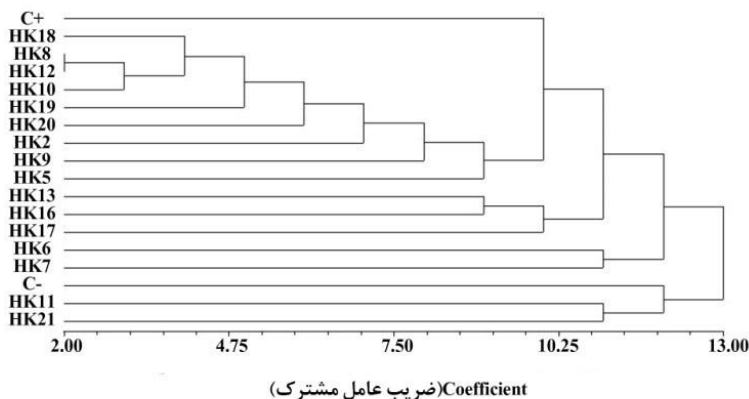


**تصویر ۶.** نمودار مقایسه درصد شدت و پهنای باندهای DNA نمونه‌ها در ۳۵۰ bp توسط نرم افزار ImageJ 1.52v (ستون ۱: سویه استاندارد کستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (ATCC 13124) به عنوان کنترل مثبت ۲: سویه کستریدیوم سپتیکوم (CN913) به عنوان کنترل منفی، ستون‌های ۳ تا ۱۸: به ترتیب نمونه‌های HK21 و HK10, HK11, HK12, HK8, HK7, HK6, HK5, HK9, HK2, HK20, HK19, HK18, HK17, HK16, HK13).



**تصویر ۷.** نمودار مقایسه درصد شدت و پهنای باندهای DNA نمونه‌ها در ۴۰۰ bp توسط نرم افزار ImageJ 1.52v (ستون ۱: سویه استاندارد کستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A (ATCC 13124) به عنوان کنترل مثبت ۲: سویه کستریدیوم سپتیکوم (CN913) به عنوان کنترل منفی، ستون‌های ۳ تا ۱۸: به ترتیب نمونه‌های HK21 و HK10, HK11, HK12, HK8, HK7, HK6, HK5, HK9, HK2, HK20, HK19, HK18, HK17, HK16, HK13).





تصویر ۸. دندروگرام فیلوژنیک نمونه‌ها در تکنیک RFLP توسط نرم افزار NTSYSPC ver: 2.02

در مطالعه Baffoni و همکاران در سال ۲۰۱۳ شناسایی گونه‌های جنس بیفیدوباکتریوم (*Bifidobacterium*) را با استفاده از تکنیک PCR-RFLP انجام دادند و گزارش کردند که با استفاده از این تکنیک به طور مؤثری می‌توان بیوتایپ‌های مختلف این باکتری را شناسایی نمود (۲۴). Alvarez-Pérez و همکاران در سال ۲۰۱۸ از تعداد ۸۰ جدایه کلستریدیوم پرفرنجس متعلق به بیوتایپ A با استفاده از تکنیک مشابه RFLP تشابهات تنوع ژنتیکی را در چهار گروه شناسایی کردند (۲۵). در مطالعه حاضر از تعداد ۱۶ جدایه کلستریدیوم پرفرنجس بیوتایپ A، با استفاده از تکنیک RFLP تشابهات تنوع ژنتیکی در چهار گروه نیز شناسایی شد. Sparks و همکاران در سال ۲۰۰۱ ژنوتایپینگ جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجس انترتوکسیژنیک را با تکنیک RFLP انجام دادند. همچنین این محققین تعدادی از جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجس با بررسی ژن *cpe* به منظور تعیین مخزن مسمومیت‌های غذایی مورد بررسی قرار دادند (۲۶). Keto-Timonen و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که با استفاده از تکنیک PCR-RFLP می‌توان سویه‌های مختلف کلستریدیوم پرفرنجس را تشخیص داد (۲۷). این محققین از ۳۷ گونه کلستریدیوم پرفرنجس جدا شده از مواد غذایی با استفاده از تکنیک PCR تعداد پنج تیپ اصلی و با استفاده از تکنیک PCR-RFLP تعداد ۲۹ سویه با تنوع ژنتیکی متفاوت تشخیص دادند (۲۷). Dorn-In و همکاران در سال ۲۰۲۲ از تکنیک RFLP با موفقیت برای ارزیابی آلودگی مواد غذایی به گونه‌های مختلف کلستریدیوم در راستای فساد مواد غذایی استفاده کردند (۲۸). این مطالعه شامل اولین تجزیه و تحلیل ژنوتیپ جدایه‌های مدفوعی *cpe* مثبت به دست آمده از بیماران مبتلا به اسهال گوارشی ناشی از مواد غذایی در آمریکای شمالی است. این محققین از تعداد ۶۵ سویه جنس کلستریدیوم با استفاده از تکنیک‌های مختلف از جمله تکنیک RFLP به دو گروه اصلی تقسیم بندی کردند. Liveris و همکاران در سال ۱۹۹۵ مشخص نمودند که تکنیک PCR-RFLP مطالعه بین جدایه‌ها را تسهیل می‌کند (۲۹). این محققین از تعداد ۳۵ گونه *Borrelia burgdorferi* با استفاده از تکنیک RFLP به دو گروه اصلی از نظر تنوع ژنتیکی شناسایی کردند. Olson و Shields در سال ۲۰۰۳ از تکنیک RFLP برای افتراق گونه‌های سیکلوسپورا (*Cyclospora*) در آب‌های محیطی بدون انجام آزمایشات باکتریایی استفاده نمودند (۳۰). Fisher و همکاران در سال ۲۰۰۵ با تکنیک RFLP ترتیب توالی‌های DNA پلاسمیدی PF5603 ژن کدکننده توکسین CPB2 جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجس انترتوکسوژنیک بیوتایپ A در بیماری‌های گوارشی انسان به دست آوردند (۳۱). Waters و همکاران در سال ۲۰۰۳ با تکنیک RFLP ترتیب توالی‌های DNA ژن کدکننده توکسین CPB2 جدایه‌های کلستریدیوم پرفرنجس انترتوکسوژنیک بیوتایپ A را در خوکچه به دست آوردند (۳۲). Alvarez-Perez و همکاران در سال ۲۰۱۷ با آزمایش بر روی ۸۰ سویه کلستریدیوم پرفرنجس با تکنیک PCR-RFLP وضعیت تنوع ژنتیکی و حساسیت به داروی مترونیدازول را بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند

که با تکنیک RFLP تنوع ژنتیکی زیادی در بین کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A بدون توجه به حساسیت می توان شناسایی نمود (۳۳).

**نتیجه گیری نهایی:** مطالعه حاضر نشان داد که تکنیک PCR-RFLP به عنوان ابزاری کاربردی و تکنیکی قابل تکرار برای تایپینگ باکتری است و به طور مؤثر و با قدرت تمایز بالا می تواند سویه های مختلف کلستریدیوم پرفرنجنس بیوتایپ A را تفکیک نماید. زیرا جهش در ژنوم می تواند منجر به تغییر در تعداد محل های برش شود. این تکنیک سریع، آسان و ارزان به منظور تعیین ژنوتیپ SNP ها و واریانت های داخل گونه ای و بین گونه ای کاربرد دارد و پیشنهاد می شود از این تکنیک برای تشخیص دیگر سویه های مختلف استفاده شود.

## سپاسگزاری

مطالعه حاضر در قالب اجرای پروژه تحقیقاتی مصوب به شماره ۲-۸۵-۱۸-۰۷۲-۹۹۰۵۳۱ مورد حمایت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی انجام گرفته است. از تمام همکاران مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه کرمان که ما را در انجام مطالعه حاضر یاری کردند تشکر و قدردانی می شود.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

- Freedman JC, Shrestha A, McClane BA. *Clostridium perfringens* enterotoxin: action, genetics, and translational applications. *Toxins*. 2016;8(3):73. doi: 10.3390/toxins8030073 PMID: 26999202
- Mehdzadeh Gohari I, A. Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A. McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence*. 2021;12(1):723-53. doi: 10.1080/21505594.2021.1886777 PMID: 33843463
- Leipig-Rudolph M, Busch K, Prescott JF, Mehdzadeh Gohari I, Leutenegger CM, Hermanns W, et al. Intestinal lesions in dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome associated with netF-positive *Clostridium perfringens* type A. *J Vet Diagn Invest*. 2018;30(4):495-503. doi: 10.1177/1040638718766983 PMID: 29621942
- Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*. 2018;53:5-10. doi: 10.1016/j.anaerobe.2018.04.011 PMID: 29866424
- Titball R, Naylor C, Miller J, Moss D, Basak A. Opening of the active site of *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin may be triggered by membrane binding. *Int J Med Microbiol*. 2000;290(4-5):357-61. doi: 10.1016/s1438-4221(00)80040-5 PMID: 11119111
- Shoukat S, Munshi ZH, Wani SA, Ali M, Kashoo ZA, Shah SA, et al. Isolation, prevalence and molecular toxinotyping of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep of Kashmir, India. *J Entomol Zool Stud*. 2018;6(6):805-8.
- Wani N, Wani SA, Munshi Z, Ahmad S, Shah MR, Hussain A, et al. Isolation and virulence gene profiling of *Clostridium perfringens* from freshwater fish. *J Entomol Zool Stud*. 2018;6(3):176-81.
- Matsuda A, Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Sumi A, Nakamura M, et al. Prevalence and genetic diversity of toxin genes in clinical isolates of *Clostridium perfringens*: Coexistence of alpha-toxin variant and binary enterotoxin genes (bec/cpile). *Toxins*. 2019;11(6):326. doi: 10.3390/toxins11060326 PMID: 31174364
- Anju K, Karthik K, Divya V, Priyadarshini MLM, Sharma RK, Manoharan S. Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry. *Anaerobe*. 2021;67:102298. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102298 PMID: 33220406
- Molan K, Žgur Bertok D. Small prokaryotic DNA-binding proteins protect genome integrity throughout the life cycle. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):4008. doi: 10.3390/ijms23074008 PMID: 35409369
- Schürch A, Arredondo-Alonso S, Willems R, Goering R. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(4):350-4. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.016 PMID: 29309930

12. Bush SJ, Foster D, Eyre DW, Clark EL, De Maio N, Shaw LP, et al. Genomic diversity affects the accuracy of bacterial single-nucleotide polymorphism-calling pipelines. *GigaScience*. 2020;9(2):1-21. [doi: 10.1093/gigascience/giaa007](https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa007) PMID: 32025702
13. Mahamat Abdelrahim A, Radomski N, Delannoy S, Djellal S, Le Négrate M, Hadjab K, et al. Large-scale genomic analyses and toxinotyping of *Clostridium perfringens* implicated in foodborne outbreaks in France. *Front Microbiol*. 2019;10:777. [doi: 10.3389/fmicb.2019.00777](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00777) PMID: 31057505
14. Ronco T, Stegger M, Ng KL, Lilje B, Lyhs U, Andersen PS, et al. Genome analysis of *Clostridium perfringens* isolates from healthy and necrotic enteritis infected chickens and turkeys. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):1-6. [doi: 10.1186/s13104-017-2594-9](https://doi.org/10.1186/s13104-017-2594-9) PMID: 28693615
15. Lacey JA, Johanesen PA, Lyras D, Moore RJ. Genomic diversity of necrotic enteritis-associated strains of *Clostridium perfringens*: a review. *Avian Pathol*. 2016;45(3):302-7. [doi: 10.1080/03079457.2016.1153799](https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1153799) PMID: 26949841
16. Abildgaard L, Engberg RM, Pedersen K, Schramm A, Hojberg O. Sequence variation in the  $\alpha$ -toxin encoding plc gene of *Clostridium perfringens* strains isolated from diseased and healthy chickens. *Vet Microbiol*. 2009;136(3-4):293-9. [doi: 10.1016/j.vetmic.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.001) PMID: 19070974
17. Rana EA, Nizami TA, Islam MS, Barua H, Islam MZ. Phenotypical identification and toxinotyping of *Clostridium perfringens* isolates from healthy and enteric disease-Affected chickens. *Vet Med Int*. 2023;2023:2584171. [doi: 10.1155/2023/2584171](https://doi.org/10.1155/2023/2584171) PMID: 36818644
18. Hustá M, Ducatelle R, Van Immerseel F, Goossens E. A rapid and simple assay correlates in vitro NetB activity with *Clostridium perfringens* pathogenicity in chickens. *Microorganisms*. 2021;9(8):1708. [doi: 10.3390/microorganisms9081708](https://doi.org/10.3390/microorganisms9081708) PMID: 34442787
19. Sheeja TE, Kumar IPV, Giridhari A, Minoo D, Rajesh MK, Babu KN. Amplified fragment length polymorphism: applications and recent developments. *Methods Mol Biol*. 2021;2222:187-218. [doi: 10.1007/978-1-0716-0997-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_12) PMID: 33301096
20. Paun O, Schönswetter P. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods Protoc*. 2012:75-87. [doi: 10.1007/978-1-61779-609-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8_7) PMID: 22419490
21. Sakurai J, Nagahama M, Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J Biochem*. 2004;136(5):569-74. [doi: 10.1093/jb/mvh161](https://doi.org/10.1093/jb/mvh161) PMID: 15632295
22. Li W, Raoult D, Fournier P-E. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(5):892-916. [doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x) PMID: 19453749
23. Chuang L-Y, Yang C-H, Tsui K-H, Cheng Y-H, Chang P-L, Wen C-H, et al. Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Res*. 2008;28(4A):2001-7. [PMID: 18649739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18649739/)
24. Baffoni L, Stenico V, Strahsburger E, Gaggia F, Di Gioia D, Modesto M, et al. Identification of species belonging to the *Bifidobacterium* genus by PCR-RFLP analysis of a hsp60 gene fragment. *BMC Microbiol*. 2013;13(1):1-9. [doi: 10.1186/1471-2180-13-149](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-149) PMID: 23815602
25. Alvarez-Perez S, Blanco JL, Astorga RJ, Gomez-Laguna J, Barrero-Dominguez B, Galan-Relano A, et al. Distribution and tracking of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* in a free-range pig abattoir and processing plant. *Food Res Int*. 2018;113:456-64. [doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.040](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.040) PMID: 30195542
26. Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):883-8. [doi: 10.1128/JCM.39.3.883-888.2001](https://doi.org/10.1128/JCM.39.3.883-888.2001) PMID: 11230399
27. Keto-Timonen R, Heikinheimo A, Eerola E, Korkeala H. Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by amplified fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(11):4057-65. [doi: 10.1128/JCM.01275-06](https://doi.org/10.1128/JCM.01275-06) PMID: 16971642
28. Dorn-In S, Mang S, Schwaiger K. Unknown cold-tolerant *Clostridium* spp.: characteristics and potential to cause meat spoilage. *Food Microbiol*. 2022;102:103916. [doi: 10.1016/j.fm.2021.103916](https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103916) PMID: 34809943
29. Liveris D, Gazumyan A, Schwartz I. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*. 1995;33(3):589-95. [doi: 10.1128/jcm.33.3.589-595.1995](https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.589-595.1995) PMID: 7751362
30. Shields JM, Olson BH. PCR-restriction fragment length polymorphism method for detection of *Cyclospora cayentanensis* in environmental waters without microscopic confirmation. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(8):4662-9. [doi: 10.1128/AEM.69.8.4662-4669.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4662-4669.2003) PMID: 12902255

31. Fisher DJ, Miyamoto K, Harrison B, Akimoto S, Sarker MR, McClane BA. Association of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. Mol Microbiol. 2005;56(3):747-62. doi: [10.1111/j.1365-2958.2005.04573.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04573.x) PMID: [15819629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15819629/)
32. Waters M, Savoie A, Garmory HS, Bueschel D, Popoff MR, Songer JG, et al. Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets. J Clin Microbiol. 2003;41(8):3584-91. doi: [10.1128/JCM.41.8.3584-3591.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3584-3591.2003) PMID: [12904359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12904359/)
33. Alvarez-Perez S, Blanco JL, García ME. *Clostridium perfringens* type A isolates of animal origin with decreased susceptibility to metronidazole show extensive genetic diversity. Microb Drug Resist. 2017;23(8):1053-8. doi: [10.1089/mdr.2016.0277](https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0277) PMID: [28346849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28346849/)