التنميط الحيوي لعتر المطثية الحاطمة المعزولة من حالات تذيفن الدم المعوي في الأغنام باستخدام تقنية الاليزا

محمد علي حمد[١]، د ناجح هبره[٢] و عبد الكريم قلب اللوز[٣]

[١] قسم الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق،
[٢] قسم الأحياء الدقيقة، [٣] قسم أمراض الحيوان، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، سوريا

(الاستلام ٣٠ كانون الأول ٢٠٠٨؛ القبول ١٣تموز ٢٠٠٩)

الخلاصة

صممت هذه الدراسة لتميز أنماط المطثية الحاطمة و ذيفاناتها في الأغنام المشتبه بإصابتها بتذيفن الدم المعوي في محافظة حماه. لهذا الغرض، تم عزل ٨٩ عزلة جرثومية من ١٣٢ عينة مأخوذة من أغنام نافقة وبعض الأغنام المذبوحة المشتبه بإصابتها بتذيفن الدم وشخصت بالاختبارات التشخيصية التقليدية وباختبار الاليزا ELISA لتحديد أنماط الجرثومة وذيفاناتها.كانت هذه العزولات بشكل عصيات موجبة الكرام، منتفخة ذات نهايات كليلة وكانت موجبة لتحلل اللسثين و الجيلاتين ومخمرة للسكريات، وسالبة للكتليز و الاوكسيديز و الاندول. اعتمادا على نتائج الاليزا فأن جميع العزلات كانت لجرثومة المطثية الحاطمة أنماط A ٨٤ عزلة (94.38 %)، D ٣ (**3.37** %)، و C ٢ (**2.25** %). النمط A كان النمط السائد في حالات تذيفن الدم المعوي في الأغنام في محافظة حماه. أن تذيفن الدم المعوي يسبب خسارة اقتصادية كبيرة لصناعة الأغنام في محافظة حماه بصورة خاصة وفي سورية بصورة عامة، لهذا السبب يوصى بتطبيق جدول تطعيم صحيح ضد تذيفن الدم المعوي على قطعان الأغنام في محافظة حماه. هذه اللقاحات يجب أن تمنح مناعة وقائية كافية ضد جميع أنماط المطثية الحاطمة و بالأخص أنماط A وD .

Biotyping of *Clostridium Perfringens* strains isolated from enterotoxemia cases in sheep using ELISA technique

M. A. Hamad[1], N. Habra[2] and A. Kalb Allouz[3]

[1] Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq,
[2] Department of Microbiology, [3] Department of Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, AL-Baath University, Syria

Abstract

The study was designed to determine the types of *Clostridium perfringens* and their toxins in sheep with suspected enterotoxemia in Hama province, Syria. For this purpose, 89 bacterial isolates were isolated from 132 samples collected from dead and some slaughtered sheep with suspected enterotoxemia and diagnosed with classical diagnostic tests and by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique to determine the types and toxins of C. perfringens. These isolates appeared as G+ bulged rods with curved ends and were as positive to lecithinase, gelatin hydrolysis and sugar fermented, as where negative to catalase, oxidase, and indole. Based on the ELISA results all isolates were *C. perfringens* types A 84 isolate (94.38 %), D 3 (3.37 %), and C 2(2.25 %). *Clostridium perfringens* type A was the dominant type in cases of enterotoxemia in sheep in Hama province detected by ELISA test. The enterotoxaemia causes considerable economic loss to the sheep industry particularly in Hama province and generally in Syria. Therefore, it is recommended that a proper vaccination schedule against enterotoxemia should be implemented for sheep flocks in Hama province. These vaccines should provide adequate protective immunity against all *C. perfringens* types specially types A and D.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

المطثية الحاطمة تسبب أمراض تذيفن الدم المعوي وأمراض معدية معوية في الحيوانات، و التسمم الغذائي، و غنغرينة، و التهاب أمعاء نخري في البشر (١-٤). تذيفن الدم المعوي enterotoxaemia الذي تسببه المطثية الحاطمة مرض معوي قاتل يؤثر على كل أنواع الحيوانات الداجنة والبشر و أحد أكثر الأمراض حدوثا في الأغنام والماعز في العالم، حيث أشارت التقارير إلى أن نسب انتشار المرض تراوحت بين ٢٤,١٣ % و ١٠٠ % (٥-٧)، وفي تركيا على سبيل المثال نسب انتشار تذيفن الدم المعوي في الأغنام بين ٣٨,٦٣ % و ٥٠ % مع عزل المطثية الحاطمة بالأنماط A، B، C، D في الأغنام، بالرغم من أن أغلبية هذه العزولات شخصت كنمط D (٨،٩).

المطثية الحاطمة صنفت إلى ٥ أنماط مولدة للذيفان toxigenic types (A، B، C، D وE) على أساس إفرازها 4 ذيفانات رئيسية: ألفا alpha، بيتاbeta، ابسيلون epsilon، و أوتا iota. الجرثومة ساكن طبيعي للأمعاء، لكن عادة موجودة بأعداد منخفضة. هذه الكائنات الحية تنتج الذيفانات بكمية قليلة وتحت الظروف الطبيعية تزال بواسطة حركات الأمعاء الطبيعية أو تكون معطلة بالأضداد الجائلة circulating antibodies. التغييرات المفاجئة في النظام الغذائي (الرعي في المراعي المعشبة السريعة النمو أو المحاصيل الحبوبية الصغيرة) أو إطعام حبوب ثقيلة (كما في التسمين feedlots) يسمح للجراثيم بالمضاعفة بسرعة. يحدث تسمم الدم عندما حركة الغذاء في الأمعاء تتباطأ أو الكائنات الحية تتضاعف وتنتج ذيفان أسرع من أن يزال أو يعادل (٣،١). الكميات الكبيرة للذيفان بالإضافة إلى أعداد كبيرة من المطثية الحاطمة يمكن أن تلاحظ عادة في المحتويات المعوية للحيوانات المريضة أو النافقة (٣،١). بما أن الجرثومة ساكن طبيعي في أمعاء الإنسان والحيوان، الكشف عن الجرثومة لوحدها ليس كافي لتشخيص المرض.

إن تشخيص تذيفن الدم المعوي عادة مستند على العلامات الإكلينيكية والنتائج المرضية، لكن تحديد الذيفانات في المحتويات المعوية ضروري لتأكيد التشخيص. الطريقة المستعملة على نحو واسع لكشف الذيفان هي اختبار حماية الفأر mouse protection test، الذي هو غالي، ويستهلك وقت (١٠)، وعلاوة على ذلك فأن معاملة الحيوانات المستخدمة في الاختبار هي غير إنسانية لذا الاختبارات خارج الجسم البديلة مطلوبة. من الناحية الأخرى، عدد من التقنيات المصلية والجزيئية تستعمل لتنميط الذيفانات، ومنها رحلان كهربائي مناعي معاكس counterimmunoelectrophoresis (CIE) (١١)، مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم Enzyme-linked immunosorbent assay (إليزا ELISA) (١٢،٥)، اختبار تراص اللاتكس latex agglutination test (LAT) (١٤،١٣)، و تفاعل سلسلة البوليميراز PCR (١٦،١٥،٧). بين هذه الاختبارات، الإليزا وتراص اللاتكس و تفاعل سلسلة البوليميراز استخدمت للتشخيص المختبري لتذيفن الدم المعوي enterotoxemia، خصوصاً في حالات تفشيات الموت المفاجئة في الأغنام. هذه الاختبارات بسيطة، محدودة الكلفة، وتعطي نتائج كمية. لذا يمكن أن تستعمل لتنميط الذيفان وللتشخيص التفريقي للتذيفن الدموي المعوي بأنماط المطثية الحاطمة A، B، C، D (١١،٥-١٣). على سبيل المثال، وجدت الإليزا دقيقة بنسبة ٩٥ % لكشف ذيفانات المطثية الحاطمة في المحتويات المعوية للأغنام المشتبه بإصابتها بالتذيفن الدموي المعوي (٢٢)، والمقارنة بين الإليزا و تراص اللاتكس أظهرت بأن الاليزا حساسة بنسبة ٩٦,٥ % ونوعية بنسبة ٩٥,٢ % (١٣)، حيث إلاليزا حساسة بما فيه الكفاية لاكتشاف كمية صغيرة بحدود ١ ng / مليلتر من ذيفانات بيتا و أوتا النقية و ٠,١ ng / مليلتر من ذيفان ابسيلون المنقى (١٧). من المعروف جيدا أن تلقيح الأغنام ضد المطثية الحاطمة مهم جداً لمنع تذيفن الدم المعوي (١٨،١٩)؛ على أية حال، الأنماط الحيوية biotypes للمطثية الحاطمة المسببة لتذيفن الدم المعوي في منطقة معينة يجب أن تميز لكي يصاغ لقاح مناسب. لذا، الأنماط الحيوية للمطثية الحاطمة يجب أن تحدد في الأغنام المصابة بالمرض وهو هدف الدراسة الحالية المتضمنة تحديد الأنماط الحيوية للمطثية الحاطمة و ذيفاناتها المعزولة من الأغنام المشكوك بإصابتها بتذيفن الدم المعوي باستعمال إلاليزا.

المواد وطرائق العمل

تم عزل ٨٩ عزلة جرثومية من ١٣٢عينة مأخوذة من أغنام نافقة و أخرى مذبوحة مشتبه بإصابتها بتذيفن الدم المعوي وشملت هذه العينات على الأمعاء وبعض الأحشاء الداخلية وتم تشخيص هذه العزولات بالطرق التقليدية بالزرع في الأوساط السائلة والصلبة المناسبة والانتقائية ومنها وسط الثيوغليكولات Thioglycolate medium، وسط أكار المطثية الويلشية *Clostridium welchii* agar medium، وسط (Sulphadiazine-Polymyxin B-Sulphite)SPS، وسط اغار المطثيات clostridial agar) (٢٠) وتحت الظروف اللاهوائية باستخدام جرة ماكنتوش وبداخلها مغلف خاص للزرع اللاهوائي مصنع من قبل شركة ميرك، ثم بعد نمو المستعمرات تم تنقيتها ودراسة الخواص الشكلية للمستعمرات و المظهر المجهري وزرعت على اغار الدم لمشاهدة نوع التحلل الدموي ذات النطاقين Double zone hemolysis، وأجريت الاختبارات الكيميائية الحيوية النوعية للمطثية الحاطمة (٢١) مثل اختبار الكتليز، الاوكسيديز، اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم، تخمر السكريات، اختبار تحلل الجيلاتين، اختبار اللسثينيز، اختبار اللاييز. بعد ذلك اجري عليها اختبار الاليزا.

اختبار الاليزا: ELISA procedure

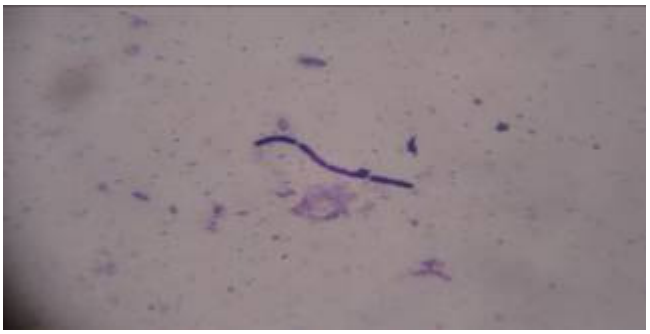
زرعت العزولات في وسط الثيوغليكولات في ظروف لاهوائية بدرجة ٣٧ °م لمدة ليلة كاملة.

وجود ذيفانات المطثية الحاطمة في الوسط الزرعي حدد باستخدام تقنية الاليزا غير المباشرة التجارية (Euroclone Life Sciences, Italy). طبقاً لتعليمات الشركة المنتجة، في الاختبار صفوف A، C، E وG محسسة بالأضداد النوعية لذيفانات ألفا، بيتا، أو ابسيلون epsilon، أو أضداد المطثية الحاطمة بينما صفوف B، D، F، وH محتوية أضداد غير نوعية. باختصار، ١٠٠ ميكروليتر من الوسط المختبر، وشواهد سلبية وإيجابية أضيفت إلى الحفر الملائمة، والصفائح بعد ذلك حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة ١ ساعة. بعد هذا الحضن الأول، الصفائح غسلت ٣ مرات بسائل الغسل washing solution، و أضيف ١٠٠ ميكروليتر من محلول الاقتران conjugate بتخفيف (١:٥٠) إلى كل حفرة وبعد ذلك حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة١ ساعة. بعد هذا الحضن وغسل الصفائح كالسابق أضيف ١٠٠ ميكروليتر من محلول المؤشر indicator solution (مزيج من مولد لون chromogen وركيزة substrate) إلى كل حفرة. كل الصفائح حضنت بعد ذلك في درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ دقيقة. بعد هذا الحضن، التفاعل وقف بإضافة ٥٠ ميكروليتر من محلول التوقف (١ مول حمض الفسفوريك). أخيراً، الكثافات البصرية optical densities (OD) سجلت في طول موجي ٤٥٠ nm باستعمال قارئ الصفيحة الدقيق micro plate reader (Tecan-spectra, Austria). الكثافة البصرية الصافية لكل عينة حسبت بطرح الكثافة البصرية للسيطرة السلبية المرافقة من القراءة لكل حفرة عينة. طبقاً لنشرة بيانات المنتج، الحد الأدنى الايجابي للكثافة البصرية للمطثية الحاطمة و لذيفانات ألفا، بيتا، و ابسيلون هو 0.150 ؛ لذا، أي عينة أنتجت اختلاف في الكثافة البصرية ≤ ٠,١٥٠ اعتبرت إيجابية للذيفانات المختبرة. بالمقابل، أي عينة أنتجت اختلاف في الكثافة البصرية > ٠,١٥٠ اعتبرت سلبية.

النتائج

التشخيص التقليدي

أظهرت نتائج التشخيص الجرثومي في هذه الدراسة مستعمرات دائرية، مسطحة flat، رمادية و المظهر المجهري للجرثومة بشكل جراثيم عصوية الشكل (قضبان) موجبة الكرام (الصورة رقم ١) منتفخة قصيرة بنهايات كليلة (" صندوق السيارة Car boxes") بشكل أزواج أو منفردة أو أحيانا بشكل سلاسل قصيرة و ذات تحلل دموي مميز على أكار الدم حيث كانت المستعمرات محاطة بنطاقين من التحلل الدموي Double zone of haemolysis نطاق ضيق من تحلل دموي تام (β –haemolysis) حول وتحت المستعمرات ونطاق واسع من تحلل دموي جزئي (α-haemolysis) حول المستعمرات. أما الاختبارات الكيميائية الحيوية فأظهرت أن العزلات سالبة الكتليز و الاوكسيديز و الاندول، وموجبة لتحلل الجيلاتين ومخمرة للسكريات (جلوكوز، مالتوز، لاكتوز، سكروز) (الصورة رقم ٢) وعلى وسط أكار المطثية الويلشية C.W المضاف له مح البيض كانت محللة للللستين (الصورة رقم ٣) وسالبة اللاييز. أظهرت هذه الاختبارات أن العزلات الجرثومية المعزولة من العينات المرضية والبالغ عددها ٨٩ عزلة كانت جميعها من نوع المطثية الحاطمة.



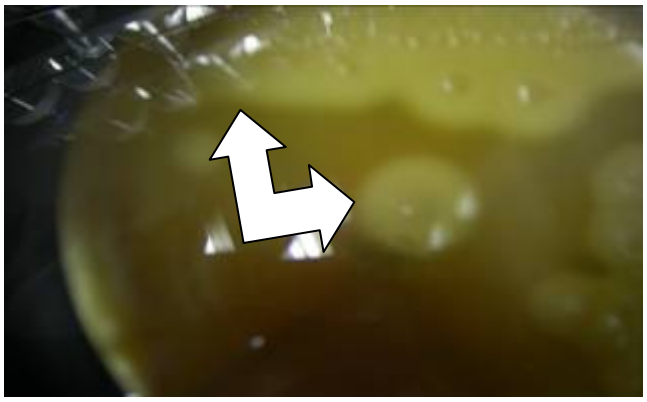
الصورة (١): جراثيم المطثية الحاطمة عصيات موجبة الغرام بشكل سلسلة قصيرة.

الصورة (٢): اختبار تخمر السكريات: الجرثومة مخمرة للكلوكوز، اللاكتوز، السكروز، المالتوز.

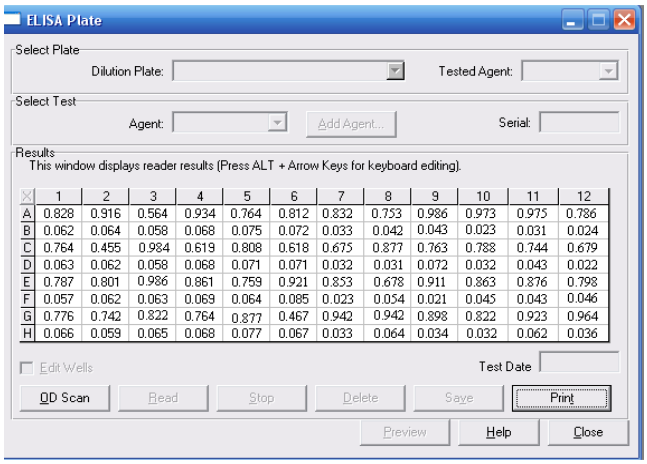
التشخيص بالا ليزا

بينت نتائج اختبار الاليزا أن العزلات الجرثومية المستخدمة في الاختبار والبالغ عددها ٨٩ عزلة المعزولة من ١٣٢ عينة (٦٧,٤ %) كانت من نوع المطثية الحاطمة. صنفت العزولات حسب نتائج التنميط اعتمادا على الذيفانات المنتجة من قبل الجرثومة (الشكل ١) إلى ٨٤ (94.38 %) عزلة من النمط A،

٣ (3.37 %) عزلة نمط D و ٢ (2.25 %) عزلة من نمط C (الجدول رقم ١). النمط A كان النمط السائد بين العزولات.



الصورة (٣): اختبار تحلل اللسثين للمطثية الحاطمة الواضحة كمناطق صفراء حول المستعمرات.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.828	0.916	0.564	0.934	0.764	0.812	0.832	0.753	0.986	0.973	0.975	0.786
B	0.062	0.064	0.058	0.068	0.075	0.072	0.033	0.042	0.043	0.023	0.031	0.024
C	0.764	0.455	0.984	0.619	0.808	0.618	0.675	0.877	0.763	0.788	0.744	0.679
D	0.063	0.062	0.058	0.068	0.071	0.071	0.032	0.031	0.072	0.032	0.043	0.022
E	0.787	0.801	0.986	0.861	0.759	0.921	0.853	0.678	0.911	0.863	0.876	0.798
F	0.057	0.062	0.063	0.069	0.064	0.085	0.023	0.054	0.021	0.045	0.043	0.046
G	0.776	0.742	0.822	0.764	0.877	0.467	0.942	0.942	0.898	0.822	0.923	0.964
H	0.066	0.059	0.065	0.068	0.077	0.067	0.033	0.064	0.034	0.032	0.062	0.036

الشكل رقم (١): صفيحة الإليزا لذيفان ألفا حيث يلاحظ أن العزولات تكون موجبة لذيفان ألفا إذا كان فرق القراءة بين كل قراءتين متتاليتين أكثر من 0.150.

الجدول (١): نتائج اختبار الإليزا.

عدد العزلات	ذيفان الفا	ذيفان بيتا	ذيفان ابسيلون	المطثية الحاطمة	نمط الجرثومة	النسبة المئوية %
٨٤	+ + +	———	———	+ + +	A	94.38
٣	+ + +	———	+ + +	+ + +	D	3.37
٢	+ + +	+ + +	———	+ + +	C	2.25

المناقشة

في الدراسة الحالية العزلات المختبرة شخصت بالطرق التقليدية على أنها جراثيم المطثية الحاطمة،وعندما اختبرت بالا ليزا كانت موجبة للذيفانات المنتجة من قبل المطثية الحاطمة.تم تحديد هذه العزلات كأنماط A، D، و C للمطثية الحاطمة مع سيادة النمط A في العزلات الموجبة لإنتاج الذيفان وهذه النتيجة مشابه لما أشارت له مراجع عديدة التي سجلت النمط A على انه النمط الأكثر سيادة في الأغنام (١٦،٦،٧) بينما أشارت مراجع أخرى إلى أن النمط D هو النمط الأكثر هيمنة المسبب لتذيفن الدم المعوي في الأغنام (٩،٨). على أية حال، بشكل مغاير لهذه الدراسات،أشارت دراسة منشورة مؤخراً بأن المطثية الحاطمة نمطA هي النمط السائد في الأغنام المشكوك بإصابتها بتذيفن الدم المعوي التي تدعم النتائج المستحصلة في الدراسة الحالية (٢٢).

استعملت الإليزا في التشخيص المختبري لحالات تذيفن الدم المعوي، خصوصاً في حالات اندلاعات الموت المفاجئة في الأغنام (٥،١١-١٣). ذكرت عدة مراجع أن إلا ليزا موثوقة بنسبة ٩٥ % للكشف عن ذيفانات المطثية الحاطمة في المحتويات المعوية للأغنام المشكوك بإصابتها بتذيفن الدم المعوي (٥،١١،٢٢). لذا، تبقى الإليزا الاختبار النوعي الأبرز لذيفانات المطثية الحاطمة.

السبب للعينات الأكثر إيجابية المستندة على إليزا أيضاً يمكن أن يكون أيضا بسبب وجود كميات منخفضة من الذيفانات، التي قد لا تكون قابلة للكشف من قبل التقنيات الأخرى (مثل تراص اللاتكس). لذا، النتائج المتحصل عليها في اختبار الإليزا يمكن أن تقبل كنسبة مئوية حقيقية لتذيفن الدم المعوي في الأغنام التي ماتت فجأة.

إن فصل الشتاء طويل والقطعان تبقى في الحظائر لأكثر من ٣ شهور. أثناء الربيع، تنمو النباتات بسرعة جداً في المراعي والقطعان توضع خارج الحظائر على المراعي وترعى كميات كبيرة من النباتات الخضراء في فترة قصيرة. على النقيض من ذلك، المحاصيل الحبوبية محصودة في فترة قصيرة في الصيف. رعي الحيوانات في المراعي تنتقل إلى هذه الحقول وتسمح باستهلاك كميات كبيرة من الحبوب، في الغالب الحنطة والشعير، في فترة زمنية قصيرة، وهي عوامل مهيأة مهمة لتذيفن الدم المعوي في الأغنام (١،٣). لذا، استهلاك كميات غير محتملة من العشب الخصب والحبوب في فترة

زمنية قصيرة قد تلعب دور في الحدوث العالي لتذيفن الدم المعوي.

تذيفن الدم المعوي يسبب خسارة اقتصادية اكبر بين حملان مغذاة على عليقة مركزة وعلى المراعي من كل الأمراض الأخرى مجتمعة، إذا التلقيح لم يجرى (٣،١). لسوء الحظ،أكثر مربي الأغنام لا يلقحون نعاجهم ضد تذيفن الدم المعوي وأكثر من نصف المالكين الذين يلقحون يعطون فقط جرعة أحادية من اللقاح. مع هذا، من المعروف جيدا أن التطعيم الأولي يجب أن يتبع بجرعة مقوية خلال ٤-٦ أسابيع لاحقاً من اجل تعزيز المناعة الوقائية (١٨،١٧). إضافة إلى ذلك، تطعيم النعاج الحبلى مهمة أيضاً لتحويل المناعة السلبية خلال اللبأ colostrum إلى الحملان الوليدة. لذا، قلة برامج التطعيم ضد تذيفن الدم المعوي في الأغنام من المحتمل جدا انه سبب آخر للحدوث العالي للمرض. فضلا عن ذلك كان يعتقد ان المطثية الحاطمة نمط D هي النمط السائد المسبب لتذيفن الدم المعوي في الأغنام؛ لكن، نتيجة الدراسة الحالية أشارت إلى أن كلا النمطين A و D يجب أن يعتبرا المسببات الرئيسية لتذيفن الدم المعوي في الأغنام. من الناحية الأخرى، حتى الآن، أكثر اللقاحات المحضرة والمعطاة لتحصين الأغنام ضد النمط D وأنماط أخرى مهملة في المحافظة، والتي قد تكون أيضاً سبب آخر للحدوث العالي للمرض.

من المعروف جيدا أن تذيفن الدم المعوي يسبب خسارة اقتصادية كبيرة إلى صناعة الأغنام بسبب نسبة هلاكات عالية، انخفاض الإنتاجية، وزيادة كلف المعالجة (٩،٧). في الدراسة الحالية، معدل الهلاكات في القطعان تراوحت بين ٣,٢ % و٢٣,٣ %. فضلا عن أن ٦٧,٤ % من العينات التي جمعت من الأغنام كانت إيجابية لتذيفن الدم المعوي من قبل اختبار الإليزا. لذا، تقترح نتيجة الدراسة الحالية أن المرض يسبب خسارةَ اقتصادية رئيسية لصناعة الأغنام في حماه بشكل خاص وفي سورية بشكل عام، حيث يبلغ عدد الأغنام في سورية ٢١٣٨٠٠٣٠، وفي حماه ٢٥٩١٤١٩ حسب إحصائية وزارة الزراعة لعام ٢٠٠٦. من الناحية الأخرى، الخسارة الاقتصادية المسببة بالأمراض المطثية يمكن أن تمنع بالإدارة وتوقيت التطعيم المناسبين (١-٣). وهكذا، يمكن أن يقترح تهيئة لقاح مناسب يعطى للتحصين ضد كلا النمطين A وD في الأغنام في محافظة حماه.

نستنتج من هذه الدراسة أن المطثية الحاطمة أنماط A، B، C وD قد تسبب تذيفن الدم المعوي، لكن النمطين A وD كانا المسببين السائدين للمرض في أغنام محافظة حماه. لذا، يوصى بشدة بأن ينفذ جدول تطعيم لتقليل حدوث تذيفن الدم المعوي. هذا اللقاح يجب أن يولد مناعة وقائية كافية، خصوصا ضد المطثية الحاطمة أنماط A و D.

المصادر

1. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology 6th ed. Edinburgh, New York: Mosby ; 2004. 191-208p.
2. Davies RH, Wray C. Seasonal variations in the isolation of *Salmonella typhi- murium*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from environmental samples. Zentralbl Veterinarmed. 1996;43:119-127.
3. Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin Microbiol Rev. 1996;9:216-234.
4. Itodo AE, Adesiyun AA, Adekeye JO, Umoh JU. Toxintypes of Clostridium perfringens strains isolated from sheep, cattle and paddock soils in Nigeria.Vet Microbiol. 1986;12:93- 96.
5. El Idrissi AH, Ward GE. Evaluation of enzyme-linked immuno - sorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. Vet Microbiol. 1992;31:389-396.
6. Miserez R, Frey J, Buogo C, Capaul S, Tontis A, Burnens A, Nicolet J. Detection of alpha- and-epsilon-toxigenic Clostridium perfringens type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). Lett Appl Microbiol. 1998;26:382-386.
7. Greco G, Madio A, Buonavoglia D, Totaro M, Corrente M, Martella V, Buonavoglia C. *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteric pathologies in Italy. Vet J. 2005;170: 346-350.
8. Osturk G. Etiopathology of enterotoxaemia in small ruminants in Elazıg and surrounding cities. Turk J Vet Anim Sci. 1996;20:63-68.
9. Ozcan C, Gurcay M. Enterotoxaemia incidence in small ruminants in Elazıg and surrounding provinces in 1994-1998.Turk J Vet Anim Sci. 2000;24:283-286.
10. Duchesnes C, Granum PE, Menozzi MG, Peck M, Pelkonen S, Popoff M, Stackebrandt E and Titball R.EUROPEAN COMMISSION- European Conce- rted Action QLK2-CT2001-01267: Clostridia in medical, veterinary and food microbiology Diagnosis and typing. Key Action 2 – Control of infectious diseases EUR 21463 EN. 2006.
11. Henderson TG. The detection of *Clostridium perfringens* type D enterotoxin in the intestinal contents of animals by counter immuno-electrophoresis. N Z J Sci. 1984;27:423-426.
12. Naylor RD, Martin PK, Sharpe RT. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. Res Vet Sci. 1987;42:255-256.
13. McClane BA, Snyder JT. Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of *Clostridium perfringens* type A entero- toxin. J Immunol Methods. 1987;100:131-136.
14. Martin PK, Naylor RD. A Latex agglutination test for the qualitative detec- tion of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. Res Vet Sci. 1994;56:259-261.
15. Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1997;35:228-232.
16. Kalender H, Ertas HB, Cetinkaya B, Muz A, Arslan N, Kılıc A. Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multi- plex PCR. Vet Med-Czech. 2005;50:439-442.
17. Nagahama M, Kobayashi K, Ochi S, Sakurai J. Enzyme-linked immuno- sorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol Lett. 1991;68(1):41-4.
18. Dela Rosa C, Hogue DE, Thonney ML. Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. J Anim Sci. 1997;75:2328-2334.
19. Bernath S, Fabian K, Kadar I, Szita G, Barna T. Optimum time interval between the first vaccination and the booster of sheep for *Clostridium perfrin- gens* type D. Acta Vet Brno. 2004;73:473-475.
20. Anita CD, David CV, Paul SM, Ellis RP. Comparison of the odds of isolation,genotypes, and in vivo production of major toxins by clostridium perfringens obtained from the gastrointestinal tract of

dairy cows with hemo-rrhagic bowel syndrome or left –displaced abomasums.JAVMA 2005;227(1):132-138.

21. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Diseases. USA: Blackwell publishing Company; 2003. 84–96p.

22. Gokce HI,, Genc O, Sozmen M, Gokce G. Determination of Clostridium perfringens Toxin-Types in Sheep with Suspected Enterotoxemia in Kars Province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2007; 31(5):355-360.