DOI: 10.22092/vj.2017.109904.1291 شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مقایسه ایمنی‌زائی سویه‌های حاد و واکسینال *باسیلوس آنتراسیس* در مدل حیوانی خرگوش

•سیدرضا احمدی‌نیا (نویسنده مسئول)

کارشناس آزمایشگاه واکسن و سرم، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• مجید تبیانیان

عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• کیوان تدین

عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• افشین حاجی‌زاده

مسئول آزمایشگاه کنترل واکسنهای باکتریایی هوازی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• بیوک آقاتنها

کارشناس آزمایشگاه واکسن و سرم، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵-۱۲-۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۷-۱۷

Email: ram546291@yahoo.com

چکیده

سیاه زخم (شاربن) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام است که با ورود باسیلوس آنتراسیس به بدن میزبان ایجاد می‌گردد. واکسیناسیون نشخوارکنندگان به عنوان موثرترین استراتژی کنترل بیماری به مدت چندین دهه در ایران درحال انجام است. در مطالعه حاضر توان ایمنی‌زائی سویه‌های آزمایشگاهی واکسینال (Sterne 34F2) و حاد (17jb) در مدل حیوانی ارزیابی و امکان تولید آنتی‌سرم پلی والان اختصاصی علیه شاربن جهت تشخیص مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق توده رشد باکتریایی حاصل از کشت مقدار (۵×۱۰^{۶} cfu) از سویه‌های فوق در محیط آگار خون‌دار با روش اولتراسونیکاسیون تیمار و سپس میزان پروتئین موجود به روش لوری تعیین گردید. سپس به ۱۲ سر خرگوش در شش گروه، طی سه نوبت و در فواصل دو هفته یکبار به صورت عضلانی مقادیر مشخصی از باکتری زنده سویه‌های فوق تزریق گردید. ده روز پس از انجام آخرین تزریق، خون‌گیری از ورید مارجینال طی سه مرحله به فواصل ۱۰ روز از یکدیگر انجام گردید. میزان تولید و پایداری آنتی‌بادی در خرگوش‌ها با استفاده از الایزای غیرمستقیم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تولید آنتی‌بادی در گروه تزریق شده با ۵×۱۰^{۵} cfu از سویه 17jb سی روز پس از تزریق اول بیشترین کمیت دارا می‌باشد.

کلمات کلیدی: باسیلوس آنتراسیس، سویه استرن 34F2، سویه 17jb، الایزا

Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 100-107

Investigation of humoral responses against acute and vaccinal strain of *Bacillus anthracis* in animal models

By: Ahmadinia, S.R., Laboratory Expert of Vaccine & Serum, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.; Tebianian, M., Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.; Tadayon, K., Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.; Hajizadeh A., Head of Aerobic Bacterial Vaccines Quality Control Laboratory, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.; Aghatanha B., Laboratory Expert of Vaccine & Serum, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: ram546291@yahoo.com

Received: 2017-03-08 **Accepted: 2017-10-09**

Anthrax is one of the most important zoonotic diseases in the world that it has been caused by *Bacillus anthracis*. Ruminant's vaccination is the most effective strategy to control the disease in Iran. in this study, the potential immunogenicity of (Sterne 34F2) and acute (17jb) vaccinal laboratory strains in animals model and the potential of polyvalan antiserum production are examined. in this study, the amount of bacterial growth (5×10^6cfu) of above strains were prepared in blood agar by ultrasonic method and then the rate of protein was determinated by lowry method. Twelve rabbits divided to six groups and injected intramusculary a certain amount of live bacteria strains three times by two weeks intervals. After ten days of last injection, the blood samples were taken from the marginal vein in three times with ten days interval. The rate and stability of antibodies were determinated by indirect ELISA. The results showed that the production of antibodies have the highest quantity in groups that injected with 5×10^5 cfu 17jb strain after thirty days of first injection.

Keyword: *Bacillus anthracis*, 34F2 Sterne strain, 17jb strain, ELISA

مقدمه

عامل بیماری شاربن باکتری گرم مثبت میله‌ای شکل به نام باسیلوس آنتراسیس است. این باکتری در بیرون از بدن حیوانات دور خود پوستهای تشکیل می‌دهد که به آن هاگ می‌گویند. هاگ باکتری نسبت به شرایط محیطی بسیار مقاوم بوده و می‌تواند ده‌ها سال در محیط و درون خاك زنده بماند و بعد از ورود دوباره به بدن انسان یا حیوانات باعث بیماری شود اولین باکتری است که به عنوان یک باکتری بیماری‌زا توسط کخ کشف شده است. انواع بیماری‌زای باسیل سیاه زخم دارای یک پوشش (کپسول) و ۳ پروتئین سمی به نامهای EF, LF, PA می‌باشند. کپسول برای جلوگیری از بیگانه‌خواری توسط گلبول‌های سفید لازم است. و باسیل‌هایی که فاقد این آنتی‌ژن هستند توسط گلبول‌های سفید از بین می‌روند. EF باعث ایجاد ادم می‌شود و همچنین باعث اختلال در سیستم ایمنی میزبان می‌شود. LF همچنان که از اسمش پیداست با مکانیسم‌هائی که هنوز ناشناخته است باعث مرگ می‌شود. مهم‌ترین مکانیسم شناخته شده آن از بین بردن ماکروفاژها به علت خاصیت پروتئازی آن می‌باشد. PA همچنان‌که از نامش پیداست عامل حمایت‌کننده است و دو فاکتور قبلی بدون اتصال به این فاکتور کارائی خود را از دست می‌دهند. باکتری باسیلوس آنتراسیس دارای دو پلاسمیدهای pXO1 و pXO2 که فاکتورهای حدت‌زا را کدگذاری می‌کنند. پلاسمید حساس به حرارت (110 MDa) pXO1، با حمل ژن‌های *lef*، *pag* و *cya* به ترتیب (Lethal Factor) Protective Antigen (PA) و Edema Factor (EF) که مجموعا اگزوتوکسین شاربن را تشکیل می‌دهند، کدگذاری می‌کند. آنتی‌ژن حفاظتی ابتدا به گیرنده‌های موجود در دیواره سلولی متصل شده و سپس به عنوان جایگاه اتصال ۲ فاکتور دیگر عمل می‌کند. PA *(83kDa)* پس از تماس با پروتئاز فورین، موجود در خون یا سطح سلول‌های یوکاریوت، ابتدا به قطعه *63 kDa* شکسته شده و سپس با استفاده از خاصیت پروتئولیتیکی خود باعث انتقال یك یا هر دو فاکتور به داخل سیتوپلاسم سلول شده و اثرات مخرب خود را ایجاد می‌نماید. LF *(87kDa)* یک اندوپپتیداز متالوآنزیم یا متالوپروتئاز وابسته به Ca و Zn است. LF پروتئین کینیاز-کینیاز فعال شده از طریق میتوژن (MAP) را غیر فعال کرده ، نهایتا منجر به مهار رشد و بلوغ سلولی می‌شود که عمدتا ماکروفاژها متاثر می‌گردند. در نتیجه به علت ترشح TNF -ά ، اینترلوکین ۱ بتا و دیگر سایتوکاینها، شوك سپتیك ایجاد و مرگ حادث می‌گردد. خون‌ریزی در این بیماری ناشی از اثرات تخریبی LF بر اندوتلیوم عروقی است. EF (*89kDa*) یک آدنیلات سیکلاز وابسته به کالمودولین است که تولید cAMP را از ATP میزبان در سیتوپلاسم سلول‌های یوکاریوت فراهم می‌کند. افزایش cAMP در داخل سلول، هوموستاز آب و املاح را مختل کرده و باعث ایجاد ادم می‌شود. این فاکتور با تخلیه ذخیره ATP، نوتروفیل‌ها را غیرفعال می‌نماید. پلاسمید pXO2 (60 MDa) ، کپسول

پلی‌گاما دی‌گلوتامیك اسید (PGA) را کدگذاری می‌نماید. کپسول شاربن دارای بار منفی است و به علت هم بار بودن با ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها، مانع فاگوسیتوز می‌شود. از طرفی به علت ممانعت از فعال‌سازی کمپلمان از مسیر آلترناتیو، باعث حفاظت باکتری از سیستم ایمنی میزبان شده و به عنوان دومین عامل حدت شاربن به حساب می‌آید (۱۳). شاربن (سیاه زخم) از دیر باز در کشور ما شایع بوده و خسارات و تلفات زیادی در انسان و جمعیت دامی کشور ایجاد می‌کرد به طوری که در اواخر جنگ جهانی دوم حدود یك میلیون راس گوسفند در ایران در اثر شاربن تلف شد. ولی با اقدامات وسیع و مؤثر سازمان دامپزشکی برای پیشگیری از این بیماری، ابتلا و تلفات در سال‌های اخیر به شدت کاهش یافته و به حدود ۱۰۰ راس در سال رسیده است. در بسیاری از استان‌های کشور این بیماری بیش از ده سال است که در جمعیت انسانی و دامی گزارش نشده است. اما هنوز در برخی از استان‌ها و مناطق به صورت موردی و اتفاقی دیده می‌شود(۸). در حال حاضر در برخی کشورهای افریقایی بیماری بسیار شایع است. در برخی کشورهای آسیایی نیز بیماری بومی بوده و گاهی دیده می‌شود. در کشورهای آمریکایی و اروپایی بیماری موردی و نادر است. در تعداد کمی از کشورها از جمله مصر سال‌ها است که بیماری گزارش نشده است (۳).

شاربن یا سیاه زخم از شخص به شخص یا از دام به دام منتقل نمی‌شود. ولی چون هاگ باکتری عامل بیماری به مدت طولانی در خاك زنده می‌ماند، حیوانات در هنگام چرا در مراتع آلوده، مبتلا می‌شوند. انسان از طریق تماس و یا مصرف فراورده‌های دامی خام یا فراوردهایی که خوب پخته نشده باشند و همچنین ضایعات و ترشحات حیوانات الوده و یا خاك آلوده آلوده می‌شود. البته احتمال انتشار آلودگی بوسیله بیوتروریسم نیز وجود دارد (۶).

در مناطقی که بیماری در سال‌های قبل مشاهده شده است برای پیشگیری از بیماری باید واکسیناسیون شاربن در دام‌ها انجام شود. واکسن شاربن از اسپورهای زنده باسیلوس آنتراسیس تشکیل شده و از نظر خلوص، استریلیتی، ایمنی‌زایی و بی‌ضرری طبق استانداردهای جهانی می‌باشد. واکسن حاوی اسپور باسیلوس آنتراسیس سویه استرن به تعداد cfu $۱۰^{۶}$×۱۲-۸ در یك میلی‌لیتر و مرتیولات به مقدار ۱ در ۲۰۰ هزار می‌باشد. واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته بشکل مایع بیرنگ و شفاف می‌باشد. این واکسن برای ایمن‌سازی فعال علیه بیماری شاربن در گوسفند، بز، گاو و سایر حیوانات حساس مصرف می‌شود. دز مصرف در دام‌های بزرگ گاو، اسب ۲ میلی‌لیتر، و دام‌های کوچک گوسفند و بز ۰/۵ میلی لیتر تزریق بصورت زیر جلدی بوده و یکبار تزریق آن حداقل به مدت یك سال ایجاد مصونیت می‌نماید (۱۱).

آلودگی محیط در شیوع بیماری شاربن اهمیت بسیار زیادی دارد بنابراین جلوگیری از آلودگی محیط یکی از راه‌های بسیار مهم کنترل بیماری است. و چون دام آلوده در آلودگی محیط اهمیت خاص دارد بنابراین برخورد صحیح با دام‌های آلوده باعث جلوگیری از آلودگی محیط خواهد شد. لذا لازم است دامی را که مبتلا به شاربن می‌شود و تلف می‌گردد به نحو شایسته دفن گردد. لازم به ذکر است که باکتری در داخل بدن دامی که تلف شده است به صورت باکتری بدون هاگ می‌باشد که بسیار حساس است و زود از بین می‌رود. اما در بعضی روستاها معمول است که پوست دام تلف‌شده را می‌کنند. اگر لاشه باز شود و یا پوست آن کنده شود باکتری موجود در بدن دام با هوا تماس پیدا می‌کند و به حالت هاگ و مقاوم درمی‌آید و می‌تواند ده‌ها سال در محیط زنده بماند و دوباره باعث بیماری گردد (۴).

روش‌های مختلف برای شناسایی باسیل شاربن، شامل: مشاهده علایم و معاینات بالینی، مشاهده میکروسکوپی اسمیر رنگ‌آمیزی شده خون با گیمسا، تزریق به حیوان حساس، PCR و روش‌های سرولوژیک است. علیرغم وجود علایم اختصاصی در دام‌های مبتلا به شاربن، تشخیص قطعی منوط به انجام آزمایش‌های مختلف و اخذ تاییدیه آزمایشگاه می‌باشد که این امر در مواردی زمان بر و هزینه‌بر می‌باشد (۱۰). در مطالعه حاضر توان ایمنی‌زائی سویه‌های آزمایشگاهی واکسینال (Sterne 34F2) و حاد (17jb) باسیلوس آنتراسیس در مدل حیوانی (خرگوش) ارزیابی گردیده است و امکان تولید آنتی‌سرم پلی والان اختصاصی بر علیه این باکتری با هدف کاربرد آن در تشخیص مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲).

مواد و روش کار

کشت باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن بروش سونیکاسیون

محتویات دو آمپول شیشهای لیوفلیزه حاوی سویه‌های بی‌ضرر واکسینال 34F2 و حاد آزمایشگاهی 17jb باسیلوس آنتراسیس از آرشیو میکروبی موسسه رازی با استفاده از ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی نرمال بازیافت و از سوسپانسیون هر سویه به صورت مجزا برای تلقیح محیط کشت آگار خون‌دار (۱۸-۱۴ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. یک سوسپانسیون باکتریایی با غلظت cfu/ml $۱۰^{۶}$ × ۵ (معادل یک دوز گوسفندی واکسن شاربن) از هر یک از دوسویه بروش کلنی کانت تهیه و از تمام آن برای تلقیح یک پلیت ۱۰ سانتی‌متری آگار خون‌دار استفاده شد. پس از انکوباسیون توده رشد باکتری با استفاده از ۱۰ میلی لیتر PBS از سطح پلیت شسته و سوسپانسیون بدست آمده جمع‌آوری شد. به منظور تهیه آنتی‌ژن پیکره باکتری این شیرابه به روش اولتراسونیکاسیون با دستگاه Hielscher مدل UP۲۰۰H به مدت ۲۴ دقیقه با امپلیتیو(قدرت)۱۰۰ درصد وسیکل ۱ در دمای خنک کنار یخ سونیکه گردید. میزان پروتئین موجود در فرآورده حاصل از سونیکاسیون به روش لوری اندازه‌گیری گردید.

تلقیح باکتری به حیوان آزمایشگاهی و القاء ایمنی

از خرگوش به عنوان مدل حیوانی استفاده شد. هیچ یک از دوسویه 34F2 و 17jb برای خرگوش بیماری‌زا نیستند و تهیه سرم به دلیل تولید حجم بیشتر و سادگی عملیات خون‌گیری راحت تر از حیوانات آزمایشگاهی دیگر قابل انجام می‌باشد. دوازده سر خرگوش در ۶ گروه دوتایی تقسیم شدند. به هریک از خرگوش‌ها در سه نوبت به فواصل زمانی ۲ هفته (روز صفر، روز پانزده ام و روز سی‌ام) یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به صورت زیرجلدی به گونه‌ای تلقیح گردید که مقادیر cfu $۱۰^{۵}$ × ۵ وcfu $۱۰^{۶}$ × ۵ از سویه 34f2 به ترتیب به حیوانات گروه اول و دوم و مقادیر cfu $۱۰^{۵}$ × ۵ ، cfu $۱۰^{۶}$ × ۱ ، cfu $۱۰^{۶}$ × ۲ و cfu $۱۰^{۶}$ × ۵ از سویه 17jb به ترتیب به گروه‌های سوم تا ششم تزریق گردید. طی سه نوبت به فواصل ده روز (روزهای دهم، بیستم و سی‌ام) پس از اولین تزریق از ورید مارجینال

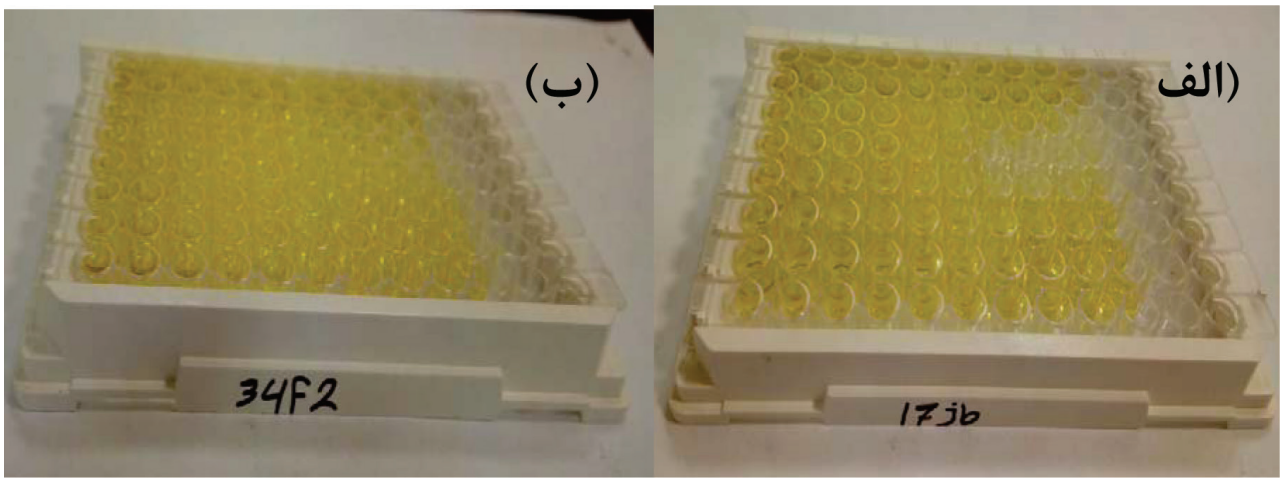
جدول۱- گروه‌های مطالعه و مقادیر باکتری تزریق شده

گروه ها	مقدار تزریق	آنتی‌ژن‌های تزریقی
اول	۵x۱۰^۵	سویه 34f2
دوم	۵x۱۰^۶	سویه 34f2
سوم	۵x۱۰^۵	سویه 17jb
چهارم	۱x۱۰^۶	سویه 17jb
پنجم	۲x۱۰^۶	سویه 17jb
ششم	۵x۱۰^۶	سویه 17jb

(ورید گوش) حیوانات تحت آزمایش خون‌گیری انجام گرفت. دو هفته بعد از انجام تزریق سوم (روز چهل و پنجم) از قلب خرگوش‌ها خون‌گیری انجام پذیرفت و سرم خون در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

آزمایش الایزا و تعیین عیار آنتی‌بادی اختصاصی

آزمایش الایزا با استفاده از کیت غیرتجاری بومی انجام گردید. در مرحله کوتینگ به هر چاهک پلیت اول مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده از آنتی‌ژن سونیکه شده سویه 34F2 و بافر کوتینگ و به هر چاهک پلیت دوم مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول تهیه شده از آنتی‌ژن سونیکه شده سویه 17jb و بافر کوتینگ استفاده شد. پلیت‌های کوت شده به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس با استفاده از سه نوبت شستشو داده شدند. در مرحله بلاکینگ به هر چاهک مقدار میکرولیتر از بافر بلاکینگ محتوی ۳ درصد شیر اضافه شد. پلیت‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۳ نوبت شستشو یکصد میکرولیتر از هر نمونه سرم به چاهک هدف اضافه شد و پلیت‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از آن یک نوبت شستشو داده شدند. در مرحله بعد مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی کونژوگه (با رقت ۱/۲۰۰۰) به چاهک‌ها اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت یک ونیم ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و یک نوبت شستشو داده شدند. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر TMB به عنوان سوبسترا به هر چاهک اضافه گردید و ۵-۲ دقیقه بعد تغییرات رنگی محتویات داخل چاهک‌ها با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ نرمال متوقف گردید. در پایان میزان جذب نوری محتویات چاهک‌ها توسط دستگاه طیف سنج



شکل ۱- نمایی از پلیت‌های الایزای پوشیده شده با آنتی ژن سویه‌های 17jb (الف) و 34F2 (ب)

جدول۲ - نتایج OD نمونه ها حاصل ازپلیت الایزای کوت شده با آنتی ژن 34f2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.588	2.390	1.860	2.459	1.875	0.848	1.617	2.595	2.342	2.104		
B	2.558	2.355	1.622	2.054	1.805	2.138	2.187	2.229	0.450	0.574		
C	2.448	2.029	2.716	2.062	1.714	1.977	0.611	0.500	0.977	0.522		
D	2.452	2.553	2.307	2.136	2.009	2.089	0.703	0.535	0.552	0.499		
E	2.436	2.029	2.284	1.095	2.062	1.998	2.142	2.496	2.113	2.231		
F	2.438	2.553	2.371	2.041	2.132	2.273	2.471	2.099	2.126	2.203		
G	2.580	2.615	2.585	2.506	2.583	2.468	2.171	2.578	2.321	2.417		
H												

جدول۳- نتایج OD نمونه ها حاصل ازپلیت الایزای کوت شده با آنتی ژن 17jb

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1
2.212	2.132	1.335	2.391	1.176	0.818	1.480	2.054	1.898	1.710		
2.048	1.340	1.568	1.421	1.624	0.462	1.649	1.245	1.460	0.282		
2.163	2.381	2.224	2.126	2.145	1.795	0.057	0.046	0.292	0.472		
2.243	2.109	2.009	2.226	1.881	1.852	0.331	0.263	0.276	0.557		
2.362	2.187	2.227	1.633	1.959	1.816	1.626	1.584	1.743	1.668		
2.129	2.188	2.315	1.960	2.170	1.715	1.946	1.795	1.771	1.784		
2.320	2.486	2.290	2.113	2.059	1.964	1.983	1.986	1.790	1.802		

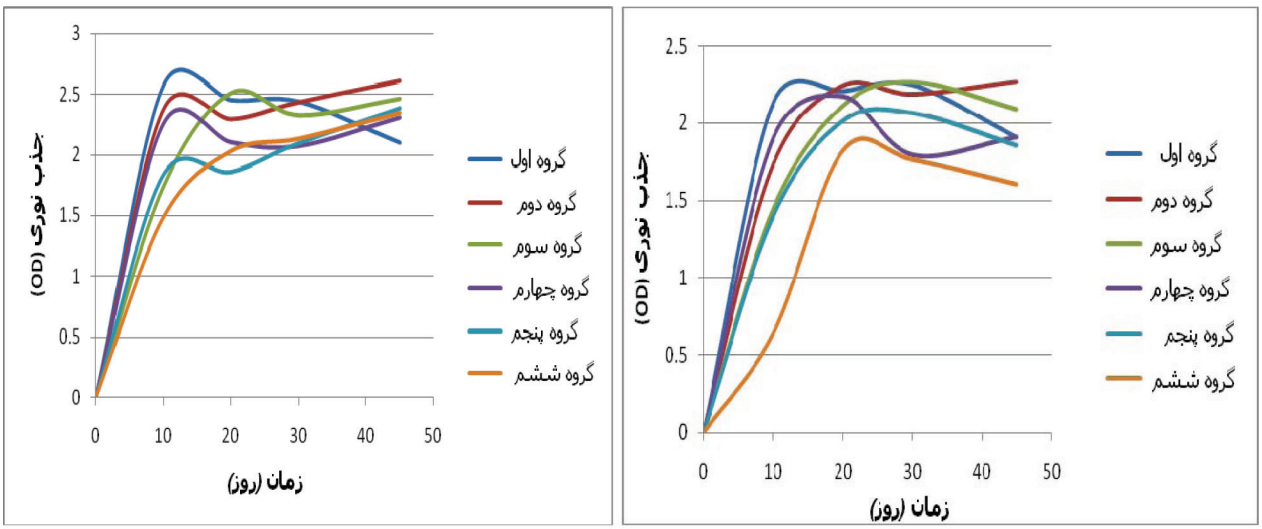
اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای هر گروه میانگین عددی خوانش سرم دو خرگوش محاسبه و به عنوان نمایه گروه در نظر گرفته شد.

آزمون‌های آماری

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS18 مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های حاصل به صورت Mean ± SEM مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده بین گروه‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس دوطرفه بین آزمودنی به همراه آزمون تعقیبی بن فرونی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف بین میانگین‌ها در سطح ($p < ۰/۰۵$) به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج نشان داد که در نمودار A از میان گروه‌های ۶ گانه در آزمایش الایزا گروه اول بیشترین میزان تولید آنتی‌بادی وگروه ششم کمترین میزان تولید آنتی‌بادی بر علیه سویه 34f2 را داشتند. تولید آنتی‌بادی در گروه سوم در روز بیستم به بیشترین میزان خود می‌رسد اما مقدار برای سایر گروه‌ها در روز دهم است و اگر چه در این گروه‌هاپس از روز دهم تولید آنتی‌بادی کاهش پیدا می‌کند، پس از روز بیستم این مقدار به صورت



نمودار۱- مقادیر جذب نوری نمونه‌های سرمی خرگوش در گروه‌های شش گانه در آزمایش الایزا علیه آنتی‌ژن سونیکه 34F2 *B. anthracis* (A) و *B. anthracis* (B) 17jb.

آهسته افزایش می‌یابد.

در نمودار B بیشترین میزان تولید آنتی‌بادی برای گروه‌های ۱ تا ۶ به ترتیب روز دهم، بیستم، سی‌ام، دهم، بیستم، بیستم بود. بیشترین تولید آنتی‌بادی توسط گروه اول در روز دهم بود و کمترین میزان تولید آنتی‌بادی توسط گروه ششم بود، اگرچه تولید آنتی‌بادی بعد از روز بیستم با کاهش همراه بود، در گروه دوم تولید به صورت آهسته افزایش پیدا کرد. و در این بین تنها نموداری که تولید آنتی‌بادی با یک شیب ملایم روبه افزایش بود و با کمترین افت همراه بود، مربوط به گروه سوم تلقیح شده با سویه ۱۷jb و بارقت cfu $۱۰^{۵}\times ۵$، در نمودار B است.

نتایج حاصل نشان‌دهنده بیشترین میزان تیتر آنتی‌بادی بر علیه سویه 34f2 در گروه سوم و در روز ۲۰ بوده است در حالی که بر علیه سویه 17jb، بیشترین میزان آنتی‌بادی در گروه سوم و در روز ۳۰ مشاهده شد.

بحث

به منظور تشخیص بیماری شاربن و جستجوی آنتی‌بادی بر علیه توکسین آن در دهه ۵۰، روش اکترلونی ابداع شد و در آن زمان تلاش فراوانی برای جداکردن و خالص‌کردن توکسین‌ها از محیط کشت انجام گرفت. هدف اصلی از ابداع این‌گونه روش‌ها علاوه بر جستجوی آنتی‌بادی بر علیه شاربن، ارزیابی توکسین‌های خالص شده بود. این توکسین‌ها، به خصوص PA عمدتا جهت ایمن‌سازی و بعنوان واکسن انسانی محسوب می‌شوند. در دهه ۷۰ روش Indirect Microhemagglutination پیشنهاد شد و در این قسمت نیز همچون آزمایش اکترلونی از PA به عنوان آنتی‌ژن اصلی استفاده می‌شد. حساسیت این روش در شناسایی افراد مبتلا به آنتراکس ۹۳ درصد گزارش شد و تا مدت‌ها به عنوان یک آزمایش انتخابی در آمریکا به کار می‌رفت (۵).

در دهه ۸۰، الایزا ابداع گردید. الایزا از برتری‌های زیادی از جمله سرعت، صحت، دقت کافی، زمان کمتر و ارزانی نسبی برخوردار بود، از این رو در بسیاری از مطالعات مورد بررسی قرار گرفت و روش‌های متفاوتی در این زمینه ارائه شد. عمدتا در این آزمایش از PA و LF به عنوان آنتی‌ژن استفاده می‌شد (۱۵).

در ضمن از آنجایی که عملا واکسن اسپوردار زنده نسبت به واکسن PA خالص، در مقابل سویه‌های بیماری‌زا مقاومت بیشتری ایجاد می‌کند، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا آنتی‌ژن‌های دیگری به غیر از توکسین‌های باسیلوس آنتراسیس در ایمنی‌زایی نقشی دارند (۷).

مطالعات پیشین نشان داده بود که استفاده از الایزا در مطالعه پاسخ سرمی به شاربن ارزش فراوانی دارد. در این میان برخی از محققین استفاده از انوا ع الایزای طراحی شده توسط محقق را براستفاده از نوع تجاری آن ترجیح می‌دهند. از عمده‌ترین علل این موضوع می‌توان به صرفه اقتصادی آن علی الخصوص با توجه به شرایط کشور اشاره نمود، و برای تنظیم یک الایزا از روش چکر بورد استفاده می‌شود، که در این حالت رقت‌های مختلفی از آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را با هم مجاورت داده تا کمترین رقت آنتی‌ژنی که بتواند پایین‌ترین رقت آنتی‌بادی (یا بالعکس) را شناسایی کند بدست آید (۱).

در سال ۱۹۸۷، Aurelia و همکاران از روش التراسونیکیشن فرم رویشی باسیلوس آنتراسیس سویه 34F2 (استرن) برای تهیه آنتی‌ژن در الایزا استفاده کردند و نتایج قابل قبولی به دست آوردند. در این بررسی به جای توکسین‌های خالص شاربن از آنتی‌ژن سونیکه در الایزا استفاده شد و استفاده از توکسین‌های خالص بخصوص PA توصیه شده است ولی به

علت دشواری مراحل خالص‌سازی وتحمیل هزینه و فقدان بعضی امکانات آزمایشگاهی، روش ساده‌تر و علمی‌تری برای تهیه آنتی‌ژن به کار گرفته شد. التراسونیکیشن روش ساده و سریعی است که با هزینه کم و به سهولت انجام‌پذیر است چون در سونیکاسیون تخریب فیزیکی است ساختار باکتری که به عنوان آنتی‌ژن می‌باشد غالبا پروتیینی است از بین نمی‌رود و در الایزا نیاز به آنتی‌ژن‌های است که ساختار پروتیینی خود را حفظ کرده باشد. آنتی‌ژن به دست آمده در این روش، در صورتی که زمان مناسب ۱۸ تا ۲۴ ساعت برای رشد و تولید کپسول باسیلوس آنتراسیس رعایت شود و سپس سونیکه شود، می‌تواند به خوبی با سرم حاوی آنتی‌بادی مونواسپسیفیک بر علیه باسیل شاربن واکنش نشان می‌دهد. چون سویه خاص و معینی از باکتری باسیلوس آنتراسیس به حیوان تزریق شد و آنتی‌بادی به دست آمده اگر چه پلی کلونال بود، مونواسپیسفیک است (۱۶).

در این مطالعه برای بررسی وجود آنتی‌بادی بر علیه باسیل شاربن از خرگوش به عنوان مدل حیوانی استفاده می‌شود چون به هنگام خون‌گیری از خرگوش خون با حجم بیشتر و به تبع آن سرم بیشتر و با کیفیت‌تری می‌توان به دست آورد(۲).

از آزمایش الایزا برای ارزیابی آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال استفاده می‌شود آنتی‌بادی‌های پلی کلونال مخلوطی از آنتی‌بادی‌های متفاوت هستند که علیه اپیتوپ‌های مختلف یک آنتی‌ژن عمل می‌کنند. در این مطالعه مقایسه چند نوع آنتی‌ژن به دست آمده به روش التراسونیکیشن استفاده شد. در برخی مقالات زمان بین ۱۶-۱۴ ساعت برای انکوباسیون قبل از التراسونیکیشن باسیلوس آنتراسیس پیشنهاد شده است. چنانچه، تجربه‌های مختلفی از کشت مایع ۱۰ الی ۱۸ ساعته در این بررسی جواب منفی داد و بین لام‌های کشت جامد ۱۶ تا ۲۴ ساعته، لام متعلق به کشت ۲۴ ساعته بیشترین فرم رویشی را داشت که به تدریج با افزایش زمان، تعداد اسپورها نیز بیشتر می‌شد. بنابراین مناسب‌ترین شرایط کشت در این مطالعه در نظر گرفتن حدود ۲۰ ساعت انکوباسیون برای کشت اولیه در محیط مایع و ۲۴ ساعت برای محیط کشت جامد است. نتایج نشان دادکه نتایج حاصل از الایزا قابل قبول و قابل اعتماد است. این اختلاف در روش اندازه‌گیری آنتی‌بادی قبلا نیز گزارش شده است (۱۴). هنری و همکاران مطالعه‌ای به منظور تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه ناحیه ۴-۲ آنتی‌ژن محافظت‌کننده باسیلوس آنتراسیس در موش و خرگوش انجام شده است (۹). ولی مطالعه حاضر بر روی سویه‌های خاصی از باسیلوس آنتراسیس بر روی حیوان مشخص (خرگوش) انجام شده است

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که در نتیجه تزریق باکتری باسیلوس آنتراسیس در خرگوش می‌توان آنتی‌بادی پلی کلونال برعلیه آنتی‌ژن‌های پیکره باکتری ایجاد کرد که این آنتی‌بادی‌ها را می‌توان با استفاده از روش الایزا ردیابی کرد و در صورت تخلیص جهت مصارف تشخیصی مورد استفاده قرار داد. با بررسی نتایج بدست آمده، رقت cfu ۵×۱۰^{۵} بهترین رقت آنتی‌ژن برای تزریق به منظور تولید آنتی‌بادی می‌باشد. و بهترین آنتی‌ژن برای تولید آنتی‌بادی آنتی‌ژن سویه 17jb می‌باشد. هم‌چنین بهترین زمان برای خون‌گیری که دارای بالاترین تیترآنتی‌بادی باشد خون‌گیری روز سی‌ام پس از تزریق است. نتایج این مطالعه نشان داد که الایزا با آنتی‌ژن سونیکه به عنوان روش تشخیصی مناسبی برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی در حیوانات واکسینه می‌باشد که نتایج دقیق‌تری را به دنبال خواهد داشت.

و نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان آنتی‌بادی باسیلوس آنتراسیس با حجم بالا (نیمه صنعتی) تولید و با طراحی روش rapid به منظورتشخیص اختصاصی عفونت شاربن و تشخیص اختصاصی حیوانات واکسینه شده استفاده کرد. و همچنین استفاده از آنتی‌ژن سونیکه باسیلوس آنتراسیس در آزمایش الایزا می‌تواند به عنوان روش تشخیصی سودمند برای اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی ایمنی‌زا در حیوانات واکسینه بکار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات بی‌دریغ کلیه مسئولین، کارشناسان و همکاران مدیریت کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Abrami, L., Bischofberger, M., Kunz, B., Groux, R., & van der Goot, F. G. 2010. Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog*, 6(3), e1000792.

2. Chen, Z., Moayeri, M. and Purcell, R., 2011. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins*, 3(8), pp.1004-1019.

3. Chakraborty, A., Khan, S. U., Hasnat, M. A., Parveen, S., Islam, M. S., Mikolon, A., ... & Zaki, S. R. 2012. Anthrax outbreaks in Bangladesh, 2009–2010. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 86(4), 703-710.

4. Chikerema, S. M., Matope, G., & Pfukenyi, D. M. 2013. Awareness and attitude toward Zoonoses with particular reference to anthrax among cattle owners in selected rural communities of Zimbabwe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases,* 13(4), 243-249.

5. Chitlaru, T., Altboum, Z., Reuveny, S., & Shafferman, A. 2011. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunological reviews*, 239(1), 221-236.

6. Hicks, C. W., Sweeney, D. A., Cui, X., Li, Y., & Eichacker, P. Q. 2012. An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Medicine,* 38(7), 1092-1104.

7. Ghosh, N., Gunti, D., Lukka, H., Reddy, B. R., Padmaja, J., & Goel, A. K. 2015. Development & validation of a quantitative anti-protective antigen IgG enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of cutaneous anthrax. *Indian Journal of Medical Research,* 142(2), 196.

8. Hashemi, S. A., Azimian, A., Nojumi, S., Garivani, T., Safamanesh, S., & Ghafouri, M. 2015. A case of fatal gastrointestinal anthrax in north eastern Iran. *Case Reports in Infectious Diseases*,

2015.
9. Honari, H., Mehrazin, H., Saadati, M., & Minaei, M. E. 2013. Production of polycolonal antibody against domain 2-4 of protective antigen of *Bacillus anthracis* in laboratory animals. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 15(6), 35-43.
10. Irenge, L. M., & Gala, J. L. 2012. Rapid detection methods for Bacillus anthracis in environmental samples: a review. *Applied microbiology and biotechnology,* 93(4), 1411-1422.
11. Livingston, B. D., Little, S. F., Luxembourg, A., Ellefsen, B., & Hannaman, D. 2010. Comparative performance of a licensed anthrax vaccine versus electroporation based delivery of a PA encoding DNA vaccine in rhesus macaques. *Vaccine*, 28(4), 1056-1061.
12. Lovchik, J. A., Drysdale, M., Koehler, T. M., Hutt, J. A., & Lyons, C. R. 2012. Expression of either lethal toxin or edema toxin by *Bacillus anthracis* is sufficient for virulence in a rabbit model of inhalational anthrax. *Infection and immunity*, 80(7), 2414-2425.
13. Rao, S. S., Mohan, K. V., & Atreya, C. D. 2010. Detection technologies for *Bacillus anthracis*: prospects and challenges. *Journal of microbiological methods,* 82(1), 1-10.
14. Sweeney, Hicks, C.W., D.A., Cui, X., Li, Y. and Eichacker, P.Q., 2012. An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive care medicine,* 38(7), pp.1092-1104..
15. Turnbull, P. C., Broster, M. G., Carman, J. A., Manchee, R. J., & Melling, J. A. C. K. 1986. Development of antibodies to protective antigen and lethal factor components of anthrax toxin in humans and guinea pigs and their relevance to protective immunity. *Infection and Immunity,* 52(2), 356-363.
16. Walper, S. A., Anderson, G. P., Lee, P. A. B., Glaven, R. H., Liu, J. L., Bernstein, R. D., ... & Goldman, E. R. 2012. Rugged single domain antibody detection elements for *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells. *PloS one*, 7(3), e32801.