DOI: 10.22092/VJ.2018.116770.1413
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی مقایسه‌ای فاکتورهای هماتولوژی، بیوشیمیایی و ایمونولوژی متعاقب تجویز واکسن توکسوئیدی پنجگانه حاوی کلستریدیوم نوویی با واکسن باکترین/توکسوئید قانقاریا عفونی کبد

• مرجان رحمان مشهدی (نویسنده مسئول)
دانشجوی دکترای تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• ناهید اطیابی
دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
• محمد همتی
استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• محسن فتحی نجفی
استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• محمد حسین فلاح مهرآبادی
موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. کرج. ایران
تاریخ دریافت: ۰۴-۱۰-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۲۳-۱۱-۱۳۹۶
Email: m.rahman.vet@gmail.com

چکیده

کلستریدیوم نوویی عامل بیماری کشنده هپاتیت عفونی نکروزان در گوسفند و ندرتا در سایر حیوانات می‌باشد. بارزترین فاکتور بیماری‌زایی آن توکسین آلفا است که توسط تیپ B تولید می‌شود. خسارات اقتصادی بیماری شامل هزینه‌های مرگ و میر گوسفندان، استهلاک مزارع درگیر و مشکلات بهداشتی لاشه‌های آلوده است. بیماری فاقد درمان بوده و کارآمدترین روش کنترل بیماری واکسیناسیون گله است که در ایران در حال حاضر بیشتر توسط واکسن‌های باکترین تولید موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام می‌شود. در این تحقیق واکسن پنجگانه توکسوئیدی کلستریدیایی حاوی کلستریدیوم نوویی تیپ B با واکسن باکترین/توکسوئید قانقاریای عفونی ساخت موسسه رازی از نظر توان ایمنی‌زایی و ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و هماتولوژی در خون خرگوش سفید نیوزیلندی مورد مقایسه قرارگرفت. تزریقات و خون‌گیری در روز صفر و ۲۱ روز بعد از آن انجام شد. دو هفته بعد از دومین تزریق خرگوش‌ها به صورت خوراکی با باکتری مورد چالش قرار گرفتند. نتایج نشان داد ایمنی‌زایی واکسن توکسوئیدی نسبت به واکسن باکترین/توکسوئید در خرگوش بصورت معناداری بهتر بوده است. فاکتورهای خونی شامل گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV (Mean Cell Volume) ،MCH (Mean cell hemoglobin) ،MCHC (Mean cell hemoglobin concentration) و پلاکت هیچ تفاوت معناداری قبل از شروع آزمون و در روز ۵۰ (بعد از چالش با باکتری) بین گروه‌های تیمار و شاهد در طول دوره ایمن سازی وجود ندارد. اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی خون از جمله کراتینین، گلوکز، پروتئین تام، آلبومین، ALT (alanine aminotransferase)، BUN (blood urea nitrogen) و AST (aspartate aminotransferase) نیز نشان داد که تفاوت معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) نسبت به گروه شاهد مشاهده نمی‌شود.

کلمات کلیدی: آلفاتوکسین، کلستریدیوم نوویی، واکسن توکسوئیدی، ایمنی زایی، واکسن باکترین

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 66-71

A comparative hematological, biochemical and immunological factors study following pentavalent toxoid vaccine containing *Clostridium novyi* with black disease bacterin/toxoid vaccine injection

By: Rahman Mashhadi, M., Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran; Atyabi N., Department of Clinical Pathology, Veterinary Faculty of Tehran University, Hemmaty, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran; Fathi Najafi M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, North East Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran; Fallah Mehrabadi, M.H., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2017-12-25 **Accepted: 2018-02-12**

Email: m.rahman.vet@gmail.com

Clostridium novyi is the pathogenic agent of the black disease, especially in sheep and rarely in other animals. The α toxin produced by *C. novyi* type B is major pathogenic agent of the disease. The economic loss of the black disease includes sheep deaths, depreciation of farms, and hygienic carcass-disposal challenges. The most efficient method to control the black disease, as an incurable disease, is vaccination. To this end, bacterin vaccine of Razi Vaccine and Serum Research Institute (RVSRI) are mainly used in Iran. In the current study, the pentavalent clostridial toxoid vaccine, containing *C. novyi* type B was compared to the black disease bacterin/toxoid vaccine of RVSRI. The study is going to detect immunogenical, biochemical and hematological changes in the blood of New Zealand rabbits before and after two administrations with three-week interval administrations. Two weeks after the last injection, the rabbits were challenged orally by the bacteria. Results showed a more significant immunogenicity of toxoid than bacterin/toxoid vaccines in rabbits. The hematological factors including white blood cells, red blood cells, hemoglobin, MCV (mean Cell Volume), MCH (mean cell hemoglobin), MCHC (mean cell hemoglobin concentration), and platelet showed no significant difference at day 50 (after bacterial challenge) during the immunization period between the case and control groups. The biochemical factors, such as creatinine, glucose, total protein, albumin, BUN (blood urea nitrogen), ALT (alanine aminotransferase), and AST (aspartate aminotransferase), were also measured. Results showed no significant difference between the case and control groups in none of them also ($p<0.05$).

Key words: Alpha toxin, *Clostridium novyi*, Toxoid vaccine, Immunization, Bacterin vaccine

مقدمه

کلستریدیوم‌ها یک گروه وسیع از باکتری‌های اسپورزا هستند که بیماری‌زایی خود را از طریق تولید توکسین‌های فعال ایجاد می‌کنند. کلستریدیوم نووی یکی از عوامل ایجاد گانگرن گازدار به عنوان فلور در خاک مناطق مختلف وجود دارد. فرم رویای باکتری در بافت تکثیر و عوامل حدت از جمله آلفاتوکسین را تولید می‌کند که موجب ادم شدید و دردناک موضعی می‌شود که می‌تواند به نکروزو مرگ منجر شود(۴).

کلستریدیوم نووی تیپ B، عامل هپاتیت نکروزان خصوصا در گوسفند وندرتا در سایر حیوانات است. خسارات اقتصادی بیماری شامل هزینه‌های مرگ و میر گوسفندان، استهلاک مزارع درگیر و مشکلات بهداشتی لاشه‌های آلوده است. بیماری فاقد درمان بوده و کارآمدترین روش کنترل بیماری واکسیناسیون گله است (۵).

بیماری‌زایی برخی باکتری‌ها همانند کلستریدیوم نووی توسط توکسین باکتری ایجاد می‌شود و نه خود باکتری، ایمنی‌زایی علیه این بیماری‌ها می‌تواند با توکسین غیرفعال شده انجام شود و از تمام اجزا باکتری جهت تولید واکسن استفاده نکرد. در نتیجه سیستم ایمنی بدن با تولید آنتی‌بادی علیه توکسین و نه کل باکتری مقاومت در برابر بیماری را ایجاد می‌کند. همچنین واکسن‌های توکسوئیدی در مقایسه با واکسن‌های غیرفعال باکتریایی ایمنی پایدارتر و طولانی‌تری و اختصاصی‌تری را ایجاد می‌کنند (۱۴, ۱۷).

واکسن کلستریدیوم نووی برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۸ تهیه و تولید شد که در ابتدا به صورت چندگانه با باکترین سایر کلستریدیاها و سپس به صورت تکی تولید گردید (۱۰). در حال حاضر واکسن باکترین کلستریدیوم نووی تیپ B در موسسه رازی مشهد تولید می‌شود و واکسن توکسوئیدی آن توسط گروهی از محققین این موسسه بصورت آزمایشگاهی تهیه شده است. واکسن‌های توکسوئیدی هم اکنون با ایمنی‌زایی بیشتر، توسط اکثر موسسات واکسن سازی در دنیا تولید می‌شوند.

افزایش تعداد واکسن در یک ویال و توکسوئیدی کردن آن (استفاده از واکسن پنتاوالان توکسوئیدی)، می‌تواند با کاهش دفعات تزریق و کاهش دزاژ مصرف، هزینه‌های واکسیناسیون را کاهش دهد.

در این تحقیق واکسن باکترین/توکسوئید قانقاریای عفونی تولیدی موسسه رازی با واکسن توکسوئیدی، از نظر توان ایمنی‌زایی و ایجاد تغییرات بیوشیمیایی و هماتولوژی در خرگوش مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

واکسن‌های مورد آزمون

در این بررسی واکسن باکترین/توکسوئید قانقاریای عفونی کبد کلستریدیوم نوویی تیپ B ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد، واکسن توکسوئیدی کلستریدیوم نوویی تیپ B تهیه شده بصورت آزمایشگاهی توسط محققین موسسه رازی مشهد مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون باقیمانده سمیت

جهت بررسی باقیمانده سمیت واکسن‌ها، به میزان نیم میلی‌لیتر از هر واکسن به صورت زیرجلدی به پنج موش سوری با وزن ۱۷-۲۲ گرم تزریق شد و سلامت موش‌ها و محل تزریق به مدت یک هفته مورد بررسی قرار گرفت.

ایمن‌سازی حیوانات

برای ارزیابی میزان ایمنی‌زایی واکسن‌ها،۳۰خرگوش سالم سفید نیوزلندی در رنج سنی سه تا شش ماه بصورت تصادفی در سه گروه ده‌تایی به شرح زیر قرار گرفتند:

۱. گروهی که واکسن باکترین/توکسوئید قانقاریا عفونی را دریافت کردند.

۲. گروهی که واکسن توکسوئیدی قانقاریا به آنها تزریق شد.

۳. گروه شاهد یا کنترل که بجای واکسن به آنها سرم فیزیولوژی تزریق شد.

خرگوش‌های مورد آزمایش چند روز قبل از انجام تزریقات به سالن‌های مربوطه انتقال یافتند تا با شرایط جدید مانوس شوند. سپس در روز صفر قبل از انجام تزریق‌ها، از آن‌ها خون‌گیری انجام شد. تزریقات نوبت اول به میزان دو سی سی واکسن مربوطه به صورت زیرجلدی در هر گروه تجویز گردید و بعد از هر تزریق، حیوانات تا هفت روز از نظر واکنش‌های محل تزریق و شرایط عمومی مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه شاهد نیز به هر ده خرگوش دو سی‌سی سرم فیزیولوژی از راه زیرجلدی تزریق گردید.

بیست و یک روز بعد نیز همانند روز صفر، قبل از تزریق، خون‌گیری انجام شد و سپس اولین تجویز یادآور به همان روش و میزان، به حیوانات تزریق شد. دو هفته بعد از آخرین تزریق یعنی در روز ۳۵، خون‌گیری نهایی انجام گردید.

بعد از خون‌گیری نهایی باکتری با دز ۱×۱۰^{۸}CFU/ml به نسبت ۱:۲ در آب مصرفی مخلوط و خرگوش‌ها به مدت سه روز مورد چالش با باکتری بیماری‌زا قرار گرفتند.

در نهایت در روز ۵۰ از اولین تزریق، خرگوش‌ها با اتر بیهوش شدند و خون‌گیری نهایی از قلب انجام گردید و عملیات کالبدگشایی و مشاهده نکروپسی بر روی تمامی گروه‌ها انجام شد. تمامی عملیات بر روی خرگوش‌ها بر اساس راهنمای رعایت اخلاق در نگهداری و استفاده از حیوانات انجام گرفت (۲, ۱۲).

تهیه سرم

خون‌گیری از خرگوش‌ها به دو صورت همراه ماده ضدانعقاد و بدون ماده ضدانعقاد انجام گرفت. سپس نمونه‌های بدون ماده ضدانعقاد جهت جدا کردن سرم به مدت نیم ساعت در دمای اتاق انکوبه شده تا لخته ایجاد شود و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سرم از خون کامل جدا گردید. سرم‌ها در میکروتیوب تقسیم و تا زمان انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و ایمنی‌زایی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند. خون‌های دارای ماده ضد انعقاد (EDTA) نیز جهت انجام تست‌های خون‌شناسی بلافاصله مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون توان ایمنی‌زایی

بر اساس استاندارد فارماکوپه اروپا (Ph Eur ۲۰۱۳)، برای انجام تست پوتنسی از روش الایزا استفاده شد(۷) و میزان آنتی‌بادی تولیدی علیه توکسین آلفای‌کلستریدیوم نوویی در هر گروه تعیین گردید. با روش الایزای غیرمستقیم، آنتی‌ژن آلفا کلستریدیوم نویی تیپ B با غلظت ۲,۴۷ µg/ml به میزان ۱۰۰ µl در گودهای الایزا ریخته شد و جهت اتصال با کف پلیت به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سرم رقیق شده با PBS به میزان ۱/۱۰۰ هر گروه به میزان ۱۰۰ µl اضافه گردید و همانند مرحله قبل به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد در مرحله بعد از Anti-rabbit antibody نشان‌دار شده با HRP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) جهت اتصال با آنتی‌بادی‌های موجود در کف استفاده شد و این مرحله Rabbit anti antibody به نسبت ۱/۳۰۰۰ رقیق شد و به میزان ۱۰۰ µl به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از o-Phenylenediamine dihydrochloride نیز به عنوان ماده رنگزا در انتهای واکنش استفاده گردید و در نهایت واکنش با استفاده از اسیدسولفوریک M ۱خاتمه داده شد و نتایج با خوانشگر الایز در طول موج ۴۹۰ nm قرائت گردید.

آزمون بیوشیمیایی

فاکتورهای مختلف بیوشیمیایی شامل کراتینین، گلوکز، ALT، BUN AST، میزان پروتئین تام و آلبومین در سرم تمامی گروه‌ها توسط دستگاه آنالیز بیوشیمیایی و کیت‌های اندازه‌گیری شرکت پارس آزمون اندازه گیری شد.

آزمون هماتولوژی

بلافاصله بعد از تمامی خونگیری‌ها، آزمون CBC (complete blood cell counter (Celltac α, MEK-6400series, Nihon kohden) با دستگاه انجام شد و شمارش تفریقی سلول‌های خونی در لام رنگ‌آمیزی شده با گیمسا صورت گرفت.

روش آماری

جهت مقایسه نتایج در گروه‌های مورد آزمون و گروه شاهد و همچنین در زمان‌های مختلف از تست‌های آماری توصیفی و Repeated measures ANOVA در نرم‌افزار SPSS استفاده شد. سطح معنادار بودن

نتایج با فرض($p < ۰/۰۵$) در نظر گرفته شده است.

نتایج

باقیمانده سمیت

در میزان تغذیه، علائم بالینی و رفتار موش‌ها پس از تزریق واکسن در تمامی گروه‌ها تغییری مشاهده نگردید. در محل تزریق هم هیچگونه واکنش جلدی دیده نشد. تمامی واکسن‌ها از نظر سلامت تایید گردیدند.

نتایج ایمن‌سازی

خرگوش‌های واکسینه در هر گروه، میزان آنتی‌بادی‌های متفاوتی را تولید کردند. نتایج O.D (Optical Density) الایزای نمونه‌ها در روز صفر و ۳۵ (دو هفته بعد از تزریق دوم) در شکل ۱ آورده شده است. در خرگوش‌های گروه واکسن توکسوئیدی به نسبت گروه واکسن باکترین موسسه رازی، میزان آنتی‌بادی بیشتری تولید شده بود و تمام این تغییرات تفاوت آماری معناداری داشتند.

نتایج آزمون بیوشیمیایی

نتایج فاکتورهای بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده به صورت میانگین ± انحراف معیار در روز۵۰ (دو هفته بعد از چالش با باکتری) در جدول ۱ آورده شده است. هیچ یک از فاکتورهای اندازه‌گیری شده تفاوت معناداری را بین گروه شاهد و گروه‌های واکسینه نشان ندادند.

نتایج آزمون خون‌شناسی

نتایج آزمون‌های خون‌شناسی به صورت میانگین ± انحراف معیاردر جدول ۲ آمده است. نتایج هیچ تفاوت معناداری را بین گروه شاهد و گروه‌های واکسینه بعد از چالش با باکتری نشان ندادند.

نتایج کالبدگشایی

در بررسی‌های ماکروسکوپیک لاشه‌ها، هیچ گونه ضایعه‌ای در قلب، ریه‌ها، معده، روده‌ها، کبد، کلیه‌ها و اندام تناسلی در هیچ‌یک از گروه‌ها اعم از گروه کنترل تا گروه‌های واکسن باکترین و توکسوئیدی مشاهده نگردید.

بحث

در مطالعه حاضر واکسن توکسوئیدی کلستریدیوم نوویی که توسط برخی از محققین در موسسه رازی شعبه شمال شرق کشور بصورت آزمایشگاهی تولید شده است از نظر پروتکل‌ها و استانداردهای بین المللی خصوصا با فارماکوپه اروپا بررسی شده و از نظر سلامت و ایمنی‌زایی آن مورد آزمون قرار گرفته و با واکسن رایج و مورد استفاده باکتریایی مقایسه شده است. بر اساس نتایج الایزا که در شکل یک آورده شده است میزان تولید آنتی‌بادی علیه توکسین اصلی ایجادکننده بیماری یعنی آلفاتوکسین متعاقب ایمن‌سازی افزایش تدریجی را نشان می‌دهد که این افزایش در واکسن توکسوئیدی به نسبت واکسن باکترین/توکسوئید رایج مورد استفاده بیشتر است و تفاوت معناداری را نشان می‌دهد. این تفاوت خصوصا بعد از تزریق واکسن یادآور بیشتر می‌شود. واکسن باکترین تولیدی موسسه رازی از نظر وجود تعداد واحد بین‌المللی آلفاتوکسین از حد ذکر شده در استاندارد فارماکوپه اروپا بیشتر بوده و بنابراین خود واکسن باکتریایی توان تولید ایمنی حفاظت کننده مناسب در حیوان را داشت و با این وجود واکسن توکسوئیدی توانست ایمنی بالاتری نسبت به واکسن رایج باکترین ایجاد نماید.

کنترل کیفیت این واکسن‌ها بر اساس مونوگراف‌های فارماکوپه اروپا انجام‌شد. انجام تست ایمنی‌زایی واکسنهای حاوی کلستریدیوم نوویی احتیاج به تزریق به خرگوش و اندازه گیری میزان آنتی‌بادی تولیدشده در سرم دارد. اندازه‌گیری آنتی‌بادی در گذشته با تزریق به موش انجام می‌شد که این تست به دلیل تناقض داشتن با حقوق حیوانات مورد چالش قرار گرفت و در فارماکوپه اروپا نیز با آزمون‌هایی از جمله الایزا وکشت سلول جایگزین شده است(۶, ۸, ۹). برای اندازه‌گیری میزان ایمنی‌زایی واکسن تزریقی از آزمون الایزا به جای تست خنثی‌سازی در موش استفاده

شکل۱ - مقایسه میزان تولید آنتی‌بادی در گروه‌های مختلف برای توکسین آلفای کلستریدیوم نوویی تیپ B: کنترل: گروه کنترل که از سرم فیزیولوژی به عنوان ماده تزریق در آنها استفاده شد. گروه باکترین که واکسن قانقاریای عفونی باکترین کلستریدیوم نووای تیپ B موسسه رازی را دریافت کردند. و گروه توکسوئید که واکسن توکسوئیدی قانقاریا به آنها تزریق شد.

فاکتور/گروه	کنترل	باکترین	توکسوئید
Creatinin (mg/dl)	1.99 ± .59	1.55 ± .14	1.38± .14
BUN (mg/dl)	33.8 ± 7.66	31.7 ± .48	31.5 ± 1.6
Glucose (mg/dl)	132.7 ± 24.45	121.4 ± 7.53	122.38 ± 10.82
ALT (IU/L)	22.2 ± 9.24	30.5 ± 8.81	35.3 ± 29.64
AST (IU/L)	30 ± 7.00	25.1 ± 9.62	32.8 ± 17.09
Total Protein (mg/dl)	6.736 ± .71	6.53 ± .27	5.97 ± 1.06
Albumin (g/dl)	4.78 ± .32	4.7 ± .17	4.1 ± .42

جدول ۱) نتایج فاکتورهای بیوشیمیایی در روز ۵۰. گروه کنترل که از سرم فیزیولوژی به عنوان ماده تزریق در آنها استفاده شد. گروه باکترین که واکسن قانقاریای عفونی باکترین کلستریدیوم نووای تیپ B موسسه رازی را دریافت کردند. گروه توکسوئید که واکسن توکسوئیدی قانقاریا به آنها تزریق شد.

فاکتور/گروه	کنترل	باکترین	توکسوئید
WBC(*10^3/µl)	6.64 ± 2.51	5.69 ± 1.71	7.88 ± 1.44
RBC(*10^6/µl)	5.40 ± 1.07	4.92 ± 1.29	5.21 ± .554
Hb(gm/dl)	12.38 ± 2.66	11.42 ± 3.11	12.43 ± 1.3
HCT(%)	39.39 ± 6.75	36.77 ± 9.64	40.28 ± 3.18
MCV(fL)	133.4 ± 187.22	75.22 ± 4.03	77.55 ± 3.20
MCH(pg)	22.9 ± 1.44	23.2 ± .6	23.9 ± .64
MCHC(%)	31.21 ± 1.93	30.87 ± 1.46	30.82 ± 1.03
PLt(*10^3/µl)	383 ± 128.93	402 ± 87.41	477 ± 112.54

جدول ۲ نتایج فاکتورهای خون‌شناسی در روز ۵۰. گروه کنترل که از سرم فیزیولوژی به عنوان ماده تزریق در آنها استفاده شد. گروه باکترین که واکسن قانقاریای عفونی باکترین کلستریدیوم نووای تیپ B موسسه رازی را دریافت کردند. گروه توکسوئید که واکسن توکسوئیدی قانقاریا به آنها تزریق شد.

گردید که البرت و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ در مقایسه دو روش الایزا رقابتی و capture با خنثی‌سازی در موش نشان دادند که این دو روش در محاسبه میزان ایمنی‌زایی در واکسن کلستریدیایی هماهنگی زیادی دارند (۹). همچنین در سال ۲۰۱۱ در کارگاه آموزشی NICEATM بررسی میزان تولید آنتی‌بادی در حیوان آزمایشگاهی توسط الایزا مورد تایید قرار گرفت (۸). Wood نیز نشان داد که استفاده از آزمون الایزا در بررسی توان ایمنی‌زایی واکسن کلستریدیوم نوویی تیپ B و سایر کلستریدیاها سریع‌تر، اختصاصی‌تر و اقتصادی‌تر از خنثی‌سازی در حیوان آزمایشگاهی است و هماهنگی خوبی با این تست دارد (۱۶). در مورد سایر واکسن‌های کلستریدیایی مانند *C. difficile* هم بررسی‌های انجام شده نشان داده که نتایج تست الایزا با خنثی‌سازی در موش برای ارزیابی میزان آنتی‌بادی تولیدی مشابه هستند (۱۱). فارماکوپه انگلیس نیز در مورد واکسن‌های کلستریدیایی استفاده از آزمون الایزا جهت تعیین میزان ایمنی‌زایی را مورد تایید قرار داده است (۱۳).

در نتایج آزمون‌های الایزا، افزایش تدریجی میزان تولید آنتی‌بادی در طول دوره ایمن‌سازی مشاهده شد که بیشترین میزان تولید آنتی‌بادی دو هفته بعد از تزریق دوم اندازه‌گیری گردید.

در سال ۱۹۹۷ Katsuhiko و همکاران با تزریق توکسوئید آلفا در مقایسه با واکسن حاوی سایر اجزا باکتری و متعاقب آن ایجاد چالش در خوکچه های مورد آزمون ثابت کردند که محافظت در برابر توکسین آلفا مهم‌ترین بخش از حفاظت علیه بیماری است (۳).

صالح و همکاران نیز از واکسن توکسوئیدی کلستریدیوم برای کنترل بیماری انتریت نکروزان در جوجه‌های گوشتی استفاده کردند و میزان آنتی‌بادی تولیدی را به وسیله تست الایزا بررسی و افزایش تدریجی آن را خصوصا بعد از دومین تزریق مشاهده کردند (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر ابودولا و همکاران نیز در پی تزریق واکسن توکسوئیدی کلستریدیوم دیفیسیل در داوطلبان سطح بالایی از ایمونوگلوبولین G علیه توکسین A را بعد از چهار تزریق در بیماران ردیابی کردند (۱).

اندازه‌گیری فاکتورهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی هیچ تفاوت معناداری را در بین گروه‌های مختلف نشان نداد مطالعات اندکی در مورد تغییرات این فاکتورها متعاقب استفاده از واکسن‌های کلستریدیایی انجام شده است اما در مقایسه با مطالعه صالح و همکاران که فاکتورهای خونی از جمله گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین و فاکتورهای بیوشیمیایی از جملهAST، ALT و BUN متعاقب چالش ایجاد شده با باکتری در گروه کنترل تغییرات معناداری را نشان داده بودند، در بررسی حاضر چون متعاقب چالش خوراکی باکتری بیماری ایجاد نگردید در نتیجه تغییری در فاکتورهای فوق نیز ردیابی نشد (۱۵). در مورد تعداد لکوسیت‌های خونی و میزان پروتئین تام و آلبومین در مطالعه حاضر

هیچ تفاوت معناداری بین گروه شاهد و واکسینه بعد از چالش با باکتری مشاهده نشد. این یافته نشان می‌دهد که برخلاف واکسن‌های زنده که طیف وسیعی از تغییرات را در بدن ایجاد می‌کنند واکسن‌های کشته براحتی توسط سیستم ایمنی بدن مورد استفاده قرار می‌گیرند بدون اینکه بر عملکرد کل سیستم‌های بدن تاثیر بگذارند. از این جهت واکسن‌های کشته و توکسوئیدی واکسن‌های بی‌خطری محسوب می‌شوند اگرچه طول دوره ایمن‌سازی توسط این واکسن‌ها به مراتب از واکسن‌های زنده کوتاه‌تر است با این وجود ایمنی مناسبی بر علیه بیماری‌های کشنده و خطرناکی چون قانقاریای عفونی ایجاد می‌نمایند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از واکسن توکسوئیدی کلستریدیوم نوویی می‌تواند ایمنی بهتری نسبت به واکسن باکترین/توکسوئید ایجاد و سطح ایمنی را به طور معناداری افزایش دهد که این امر باعث کاهش دز مصرفی واکسن شده و از نظر اقتصادی هزینه‌های واکسیناسیون را کاهش می‌دهد.

همچنین در این بررسی خرگوش‌های تحت مطالعه به صورت خوراکی با باکتری مورد چالش قرار گرفتند و با توجه به اینکه در یافته‌های بعد از مرگ هیچ تغییری در اندام‌های مختلف دیده نشد و همچنین در یافته‌های بیوشیمیایی و هماتولوژی نیز تفاوت معناداری در گروه‌های تحت مطالعه بعد از چالش مشاهده نگردید می‌توان نتیجه گرفت که خوراندن باکتری در خرگوش‌ها نتوانسته بیماری را ایجاد کند.

تشکر و قدردانی

در انتها لازم است از مجموعه موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شمال شرق کشور بخصوص بهجت مجیدی، عید محمد فولاد پناه و همکاران بخش حیوانات آزمایشگاهی بخاطر حمایت، پشتیبانی و همکاری‌های لازم صمیمانه تشکر و قدردانی شود.

منابع مورد استفاده

1- Aboudola S., K.L. Kotloff, L. Kyne, M. Warny, E.C. Kelly, S. Sougioultzis, P.J. Giannasca, T.P. Monath and C.P. Kelly. 2003. Clostridium difficile vaccine and serum immunoglobulin G antibody response to toxin A. *Infection and immunity* 71,1608-1610.

2- American, Psychological and Association. 1986. Guidelines for ethical conduct in the care and use of animals. *Journal of the experimental analysis of behavior* 45,127.

3- Amimoto K., O. Sasaki, M. Isogai, T. Kitajima, E. Oishi, N. Okada and H. Yasuhara. 1998. The protective effect of *Clostridium novyi* type B alpha-toxoid against challenge with spores in guinea pigs. *Journal of veterinary medical science* 60,681-685.

4-Aronoff D.M. 2013. *Clostridium novyi*, *sordellii,* and *tetani*: Mechanisms of disease. *Anaerobe* 24,98-101.

5- Borrmann E. and F. Schulze. 1999. Detection of *Clostridium novyi* type B α toxin by cell culture systems. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 24,275-280.

6- Borrmann E., F. Schulze, K. Cussler, I. Hänel and R. Diller. 2006. Developmentof a cell culture assay for the quantitative determination of vaccination-induced antibodies in rabbit sera against *Clostridium perfringens* epsilon toxin and *Clostridium novyi* alpha toxin. *Veterinary microbiology* 114,41-50.

7- Commission E.P., E.D.f.t.Q.o. Medicines and Healthcare. 2010. European pharmacopoeia. Council of Europe.

8- Draayer H. 2011. Overview of currently approved veterinary vaccine potency testing methods and methods in development that do not require animal use. *Procedia in Vaccinology* 5,171-174.

9- Ebert E., V. Öppling, E. Werner and K. Cussler. 1999. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* β-and ε-toxoid containing veterinary vaccines. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 24,299-311.

10- Razi Vaccine & Serum Research Institute, 2015. http://www.areeo.ac.ir/DuranPortal/Documents/Vaccine Dami/2015 1227 144736.pdf.

11- Kotloff K.L., S.S. Wasserman, G.A. Losonsky, W. Thomas, R. Nichols, R. Edelman, M. Bridwell and T.P. Monath. 2001. Safety and Immunogenicity of Increasing Doses of a *Clostridium difficile* Toxoid Vaccine Administered to Healthy Adults. *Infection and immunity* 69, 988-995.

12- Naderi M.M., A. Sarvari, A. Milanifar, S.B. Boroujeni and M.M. Akhondi. 2012. Regulations and ethical considerations in animal experiments: international laws and islamic perspectives. *Avicenna journal of medical biotechnology* 4,114.

13- Pharmacopoeia B. 2015. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical substances. *Clostridium novyi* (type B), Vaccine for veterinary use, Ph Eur Monigraph, 0362.

14- Plotkin S. 2014. History of vaccination. Proceedings of the National Academy of Sciences 111,12283-12287.

15- Saleh N., S. Fathalla, R. Nabil and A. Mosaad. 2011. Clinicopathological and immunological studies on toxoids vaccine as a successful alternative in controlling clostridial infection in broilers. *Anaerobe* 17,426-430.

16- Wood K. 1991. An alternative to the toxin neutralization assay in mice for the potency testing of the *Clostridium tetani, Clostridium septicum, Clostridium novyi* type B and *Clostridium perfringens* type D epsilon components of multivalent sheep vaccines. *Biologicals* 19,281-286.

17- World Health Organization. vaccine safty basics, e-learning coursehttp://vaccine-safety-training.org/toxoid-vaccines.html. W.H.O.