

عیار سنجی آنتی توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D در سرم خرگوش به روش الیزای غیر مستقیم

• علیرضا پردیس (نویسنده مسئول)

بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

• لیدا عبدالمحمدی خیاو

بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان ترویج آموزش توسعه کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۴-۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۵-۰۲

Email: a.pardis@rvsri.ac.ir



چکیده

کلستریدیوم پرفرینجنز یک باکتری گرم مثبت که براساس چهار توکسین اصلی آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا به پنج تیپ A تا E تقسیم می شود. توکسین اپسیلون از توکسین های قوی کلستریدیایی و توکسین اصلی تیپ های B و D و عامل بیماری گاز کانگرن در انسان و آنتروتوکسمی در دام است. ارزیابی ایمنی ناشی از واکسن که در پیش گیری از این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار بوده که در فارماکوپه روش آنتی توکسین اپسیلون می باشد. ابتدا تست اندازه گیری توانایی واکسن به روش معمول انجام یافته و سرم های اخذ شده با هر دو روش معمول و الیزای غیرمستقیم بررسی گردید. میزان cut off کنترل منفی در تست الیزا ۰/۴۲ برآورد شد و نتایج آزمون کراس نشان داد که سیستم الیزای برای توکسین اپسیلون اختصاصی عمل می نماید نتایج این پژوهش ارتباط معنی داری بین این دو تست در موارد واکسینه شده با نمونه فرمانتور نشان داد. آنالیز رگرسیون خطی، همبستگی ۰/۸۴ با $P \geq 0.01$ را نشان داد. در نهایت پیشنهاد گردید از تست الیزا به عنوان جایگزینی برای ارزیابی سطح ایمنی حیوانات آزمایشگاهی استفاده نمود. اگرچه برای استفاده در حیوانات هدف نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: الیزای غیر مستقیم- واکسن آنتروتوکسمی- کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D- آنتی توکسین اپسیلون- serum neutralization test

- Veterinary Researches & Biological Products No 128 PP: 17-30

Evaluation of Epsilon Antitoxin of *Clostridium Perfringens* Type D in The Rabbit Serum By Indirect ELISA

By: Paradise, A. R., (Corresponding Author) Department Anaerobic Bacterial Vaccine Production and Research, Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. and Abdolmohammadi khiav, L., Department Anaerobic Bacterial Vaccine Production and Research, Clostridia Research Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 2019-06-23 Accepted: 2019-07-24

Email: a.pardis@rvsri.ac.ir

Clostridium perfringens is a gram-positive bacterium divided into five major A, E, and iota toxins based on the four main toxins. Epsilon toxin is a potent clostridial toxin and a major toxin of *Clostridium Perfringens* B and D types, and is the cause of gangrene gas in humans and enterotoxemia in human. For safety assessment of the vaccine, which is important for prevention of this disease, has been proposed SN (Serum neutralization test) method in the pharmacopoeia. The purpose of this study was to evaluate the ELISA as an alternative method for measuring of epsilon antitoxin. First, vaccine potency test was performed using conventional method and the sera obtained were measured using both conventional and ELISA methods. The negative control cut-off was calculated 0.42 and cross-examination was shown that epsilon toxin had no cross reaction with other toxins of *Clostridium spp.*

The results of this study showed that there is a significant agreement between two tests for serum samples of vaccinated rabbits by polyvalent vaccine. Linear regression analysis gave correlation coefficients of 0.697 for the indirect ELISA, with a significance level of $P < 0.01$. Finally, ELISA test could be used as an alternative MNT test which used for detection antibody in laboratory animals. However, further research in this field is needed for target animals.

Key words: Indirect ELISA, enterotoxaemia vaccine, *Clostridium perfringens* type D, epsilon antitoxin, serum neutralization test

از آن زمان تا کنون تولید آن ادامه دارد. ارزیابی ایمنی ناشی از واکسن در پیش‌گیری از این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است که به روش سرم نوترالیزاسیون انجام می‌شود (۵). ولی این روش استاندارد دارای معایبی می‌باشد. روش جایگزین برون‌تنی پیشنهاد شده برای این تست الایزا می‌باشد. برای راه‌اندازی این تکنیک تلاش‌های زیادی توسط محققین صورت گرفت. اردهالی و همکاران در سال ۱۹۷۳ گوسفند را با استفاده از توکسین باکتری *C. perfringens* تیپ D هایپر ایمن کردند و سرم حیوان را جدا و خالص‌سازی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که تیتراژ آنتی‌توکسین از ۴۰۰ به ۳۰۰۰ واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر پس از تخلیص افزایش یافت (۱). در سال ۱۳۹۱ اپسیلون توکسین از *C. perfringens* تیپ D با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی تعویض کاتیونی CM-Sephrose، کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-Cellulose و ژل فیلتراسیون Sephadex-G100 تهیه شد که می‌توان از این توکسین جهت کوآنتیگ آنتی ژن و تولید آنتی‌توکسین اپسیلون استفاده نمود (۲۵). هدف از این پروژه

مقدمه

Clostridium perfringens چهار توکسین اصلی اپسیلون بتا، یوتا و آلفا و تعدادی توکسین فرعی تولید می‌نماید. که بر این اساس به پنج تیپ A تا E تقسیم‌بندی می‌شود. تیپ D عامل آنتروتوکسمی بوده که در نقاط مختلف ایران به اسامی متفاوت از جمله قلوه نرمی و زهره درد نامیده می‌شود. این باکتری حاوی فاکتورهای ویرولانسی مختلف بوده (۲۰) یکی از مهم‌ترین این فاکتورها اپسیلون توکسین می‌باشد. این توکسین به صورت پروتوتوکسین تولید می‌شود و در اثر عمل تریپسین فعال می‌شود. وزن مولکولی این توکسین ۳۲/۵ کیلو دالتون می‌باشد (۴) که توسط آنزیم‌هایی نظیر تریپسین و کموتریپسین با شکستن ۱۳ اسید آمینه از قسمت انتهای آمینی و ۲۰ اسید آمینه از انتهای کربوکسیل به صورت فعال و کشنده در می‌آید (۱۲). واکسن پلی‌والان آنتروتوکسمی که بر علیه توکسین اپسیلون *C. perfringens* ایمنی ایجاد می‌نماید برای اولین بار در سال ۱۳۲۳ در بخش بی‌هوازی موسسه رازی تولید گردید و

تهیه آنتی‌سرم نمونه‌ها

به ۱۰ سر خرگوش دو و نیم میلی‌لیتر از هر نمونه (واکسن تهیه شده در فرمانتور و بن بن) بدون ادجوانت به صورت زیر جلدی به ناحیه پشت گردن تزریق گردید. پس از ۲۸ روز تزریق دوم، به همان صورت تکرار شد. ۱۴ روز پس از تزریق دوم از قلب خرگوش‌ها تحت شرایط بیهوشی خون‌گیری انجام شد. نمونه‌ها در دور ۶۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم جداسازی گردید.

تهیه آنتی‌سرم کنترل منفی

از یک گروه خرگوش‌های تزریق شده با دو و نیم میلی‌لیتر نرمال سالین، جهت تهیه سرم منفی خون‌گیری بعمل آمد و سرم آن‌ها جدا گردید.

تهیه آنتی‌سرم کنترل مثبت

دو و نیم میلی‌لیتر از نمونه واکسینال *C. perfringens* تیپ D به همراه ادجوانت کامل فروند به صورت زیر جلدی به ناحیه پشت گردن ۱۰ خرگوش تزریق شد. پس از ۲۸ و ۵۶ روز تزریق دوم و سوم با ادجوانت ناقص فروند به همان صورت تکرار شد. ۱۴ روز پس از تزریق سوم از قلب خرگوش خون‌گیری به طریق اشاره شده در بالا بعمل آمد (۱).

طراحی سیستم الیزا برای آنتی توکسین اپسیلون در خرگوش و مقایسه استفاده از الیزا غیر مستقیم با روش SN می‌باشد.

مواد و روش کار

روش مطالعه از نوع مداخله‌ای و به شیوه کارآزمایی بالینی می‌باشد و ایمنی‌زایی واکسن به روش الیزا اندازه‌گیری می‌شود.

مواد مورد استفاده

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

دستگاه‌های مورد استفاده

دستگاه‌های مورد استفاده شامل انکوباتور سانتریفیوژ و الیزا ریدر از شرکت‌های JOUAN و EPPENDORF و BIOTEK خریداری شدند. این پروژه تحقیقاتی دارای چندین مرحله می‌باشد: ۱- تهیه توکسین اپسیلون ۲- تهیه آنتی‌سرم کنترل مثبت و منفی و نمونه‌های تست ۳- انجام تست الیزا و پتنسی بر روی ۲۰ نمونه واکسن تهیه شده در فرمانتور و ۲۰ نمونه واکسن تهیه شده در بن بن ۴- آنالیز نتایج با نرم‌افزار Excel و SPSS.

جدول ۱- لیست مواد مصرفی برای آزمون الیزای غیر مستقیم و پتنسی

شرکت	مواد
مرک	آمونیم سولفات
سیگما	کیسه دیالیز
فلوکا	تریس هیدروکلراید
مرک	فولین
فلوکا	سدیم بی‌کربنات و کربنات
فلوکا	سدیم پتاسیم تارتارات
مرک	سولفات مس
مرک	توئین ۲۰
سیگما	Goat Anti-Rabbit IgG Antibody-HRP کونژوگه
سیگما	BSA
رش	TMB
فلوکا	گلیسرین
ویبریج	آنتی توکسین استاندارد

تهیه توکسین اپسیلون

کشت باکتری کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ D

آمپول لیوفیلیزه *C.perfringens* تیپ D (CN409) را باز نموده و در محیط کشت عصاره کبد گوساله سپس در لوله‌ی معمولی حاوی عصاره کبد و در نهایت در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی عصاره کبد کشت داده شد. پس از این مرحله، محتویات ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری در ارلن حاوی محیط کشت مخصوص توکسین‌زایی کشت داده شد. محیط کشت مخصوص توکسین‌زایی حاوی پپتون، عصاره مخمر، ال-سیستین، پودر جگر، نمک، تامپون، تیکه گوشت و تریس ویتامین می‌باشد. تریس ویتامین حاوی ویتامین‌های بیوتین، تیامین، نیکوتینیک اسید، پیریدوکسین و ویتامین B12 و عناصر معدنی سولفات آهن، سولفات مس، سولفات روی، سولفات منیزیم و کلرید منگنز می‌باشد (۲۱).

بررسی وجود توکسین در کشت سلول

برای بررسی وجود توکسین اپسیلون سانتریفوژ (Eppendorf) به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۵۰۰ g انجام گردید. سپس نیم میلی‌لیتر از مایع فوقانی به سلول‌های MDCK (Madin Darby canine kidney) حاوی سرم گاوی (FCS) ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین، استرپتومایسین و ال-گلوتامین اضافه و گرد شدن سلول‌های MDCK بررسی گردید. به عنوان کنترل منفی از نرمال سالین به جای محلول حاوی توکسین استفاده شد (۱۹).

ترسیب با استفاده از نمک آمونیوم سولفات

ترسیب با استفاده از نمک آمونیوم سولفات در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام و در سردخانه چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (۲۱). سپس این محلول به مدت ۴۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. مایع رویی را دور ریخته و بر روی رسوب توسط بافر تریس هیدروکلراید عملیات دیالیز انجام گرفت. در پایان نمونه دیالیز شده جمع‌آوری و با ستون کروماتوگرافی تعویض کاتیون CM-Sepharose و در ادامه (Gel filtration) تخلیص انجام شد (۱۷). سپس میزان پروتئین و میزان حداقل دز کشندگی (Minimum Lethal Dose) مورد سنجش قرار گرفت.

پروتئین‌سنجی به روش لوری (Lowry)

در این روش از رقت‌های متفاوت پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد (۱۱).

تست MLD (Minimum Lethal Dose)

برای بررسی میزان حداقل دز کشندگی توکسین پس از سانتریفوژ (Eppendorf) به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۵۰۰ از رسوب سوسپانسیون تهیه نموده سپس رقت‌های مختلف ۱/۱۰۰ تا ۱/۱۰۰۰ را تهیه و هر رقت (نیم میلی‌لیتر) به دو موش به صورت داخل وریدی تزریق شد. آخرین رقتی که باعث مرگ موش‌ها شده به عنوان نتیجه تست MLD گزارش شد (۱۵).

سپس تست پنتنسی و الیزا به موازات هم بر روی این سرم‌ها انجام و نتایج ثبت شد.

مراحل تست پنتنسی

۱- آماده سازی محلول توکسین: ابتدا یک میلی‌گرم پودر توکسین را در یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (PH=۷) حل نموده (۱ mg/ml) سپس رقت‌های مختلف از این محلول (یک دهم تا یک میلی‌لیتر) را با سرم فیزیولوژی تهیه و هر رقت به دو موش به میزان نیم میلی‌لیتر به صورت داخل وریدی تزریق شد. آخرین رقت عامل مرگ موش برای ادامه مراحل استفاده شد.

۲- آماده سازی محلول آنتی‌توکسین استاندارد: پودر آنتی‌توکسین استاندارد خریداری شده از (شرکت Weybridge انگلستان) را در نرمال سالین و گلیسرین به نسبت ۳۰ به ۷۰ حل نموده سپس با سرم فیزیولوژی رقیق نموده تا رقت یک IU/ml تهیه گردد.

۳- تهیه سرم از دو گروه خرگوش‌های واکسینه

۴- تهیه محلول‌ها برای تزریق: رقت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹، ۰/۱۱ از آنتی‌توکسین استاندارد با یک میلی‌لیتر از توکسین مخلوط گردید. همین عمل برای آنتی‌سرم خرگوش‌های واکسینه انجام گردیده و با سرم فیزیولوژی به حجم دو میلی‌لیتر رسید. سپس لوله‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و در نهایت هر رقت به دو موش به میزان نیم میلی‌لیتر به صورت داخل وریدی تزریق گردید و میزان آنتی‌توکسین اپسیلون بر حسب واحد بین‌المللی محاسبه گردید رقت آنتی‌توکسین استاندارد/رقت آنتی‌سرم خرگوش × واحد آنتی‌توکسین استاندارد = واحد آنتی‌توکسین خرگوش IU (۵).

راه‌اندازی تست الیزا (Checkerboard)

راه‌اندازی سیستم الیزا با تهیه checker board و با استفاده از غلظت‌های متفاوتی از آنتی‌ژن اپسیلون و سرم مثبت، منفی و شاهد انجام پذیرفت. همچنین سایر فاکتورها برای بهینه‌سازی سیستم الیزا انجام پذیرفت.

تکرارپذیری واکنش‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

دو تکرار از هر نمونه جهت بررسی تکرارپذیری انجام و Standard Deviation با بررسی اطلاعات توسط Excel حاصل شد.

تست الیزا

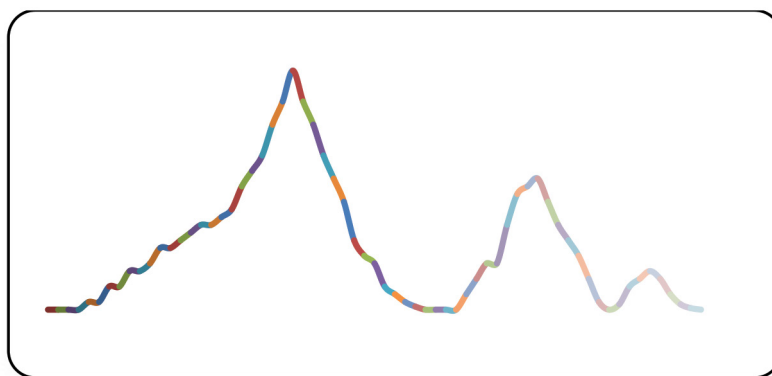
محلول توکسین اپسیلون توسط بافر کربنات با رقت ۱/۱۰۲۴ تهیه گردیده سپس ۵۰ میکرولیتر از آن در چاهک‌های میکروپلیت ریخته و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس چهار بار به مدت دو دقیقه توسط محلول شستشو (محلولی از PBS IX و توئین ۲۰) شسته شد و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول BSA ۱٪ (۱۰۰ μg/ml) به مدت ۳۰ دقیقه بلاک گردید. در مرحله بعد آنتی‌سرم‌های تست با محلول دایلونت به نسبت ۱/۱۵۰ و کنترل منفی با رقت ۱/۴۰ و کنترل مثبت با رقت ۱/۴۰۰ رقیق شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم‌های مختلف داخل ردیف‌های A1-12 ریخته شد. همچنین ۵۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌کننده (محلولی از PBS IX و BSA ۱٪) داخل تمام چاهک‌ها به جزء A1-12 ریخته شد. ۵۰ میکرولیتر از چاهک‌های ردیف A1-12 برداشته داخل چاهک‌های ردیف B1-12 ریخته و کاملاً پیتاژ نموده و داخل چاهک‌های C1-12 ریخته شد. همین عمل را برای ردیف‌های

خوانده و نتایج مورد آنالیز قرار گرفت (۱۶).
 تیتراژ ایذا مطابق فرمول زیر محاسبه گردید.
 رقت سرم \times (آنتی ژن + کونژوگه) OD زمینه - OD نمونه = محاسبه تیتراژ ایذا
 معنی دار بودن (P value) نتایج روش SN با ELISA با استفاده از نرم افزار آماری SPSS با محاسبه ضریب همبستگی (R) مقایسه گردید.

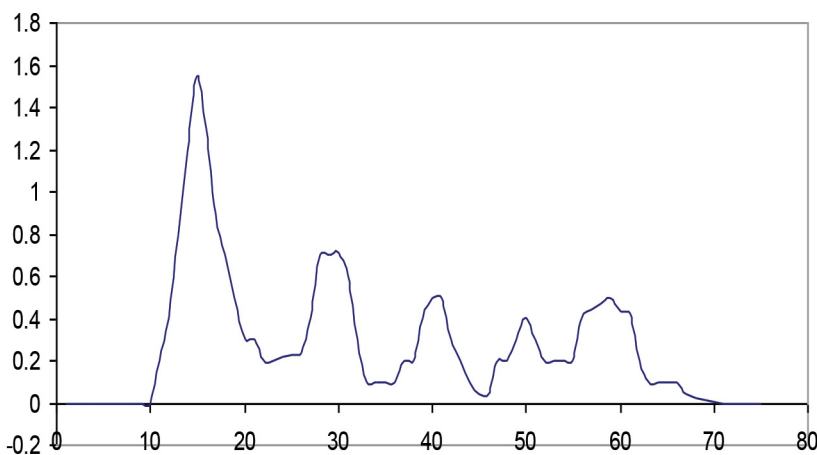
نتایج

نتایج بررسی توکسین اپسیلون در کشت سلول در تمامی مراحل

بعدی انجام داده و در نهایت ۵۰ میکرولیتر آخری دور ریخته شد و پلیت به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از اتمام زمان مورد نظر، شستشو مانند مرحله دو انجام پذیرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر کونژوگه (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody-HRP) با رقت ۱/۶۰۰۰ اضافه و بمدت ۶۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان مورد نظر، پنج بار پلیت را شسته و ۵۰ میکرولیتر TMB داخل چاهکها ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در مرحله آخر ۵۰ میکرولیتر محلول اسید کلریدریک ۱ مولار اضافه نموده و بلافاصله با دستگاه ایذا ریدر (شرکت Biotek) در طول موج ۴۵۰ نانومتر OD (جذب نوری) را



نمودار ۱ - کروماتوگرام مرحله کروماتوگرافی CM-Sepharose



نمودار ۲ - کروماتوگرام مرحله کروماتوگرافی DEAE-Cellulose

الایزا در سرم خرگوش‌های واکنش داده، مثبت و منفی طبق جدول ۳ انجام شد. مناسب‌ترین رقت برای آنتی‌ژن و آنتی‌بادی بر اساس دو فاکتور OD (جذب نوری) و تفاوت میانگین (کمترین میزان اختلاف بین تکرارها) به دست آمد.

اختصاصیت آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن

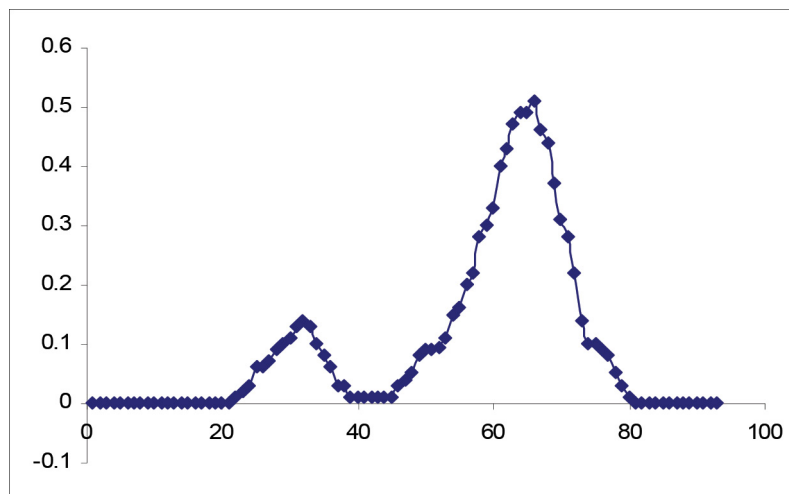
برای این منظور از توکسین بتا *C. perfringens*، توکسین آلفا *C. septicum* و *C. novyi* و باکتری *C. chauvoei* استفاده گردید. نتایج بررسی کراس برای توکسین بتا *C. perfringen* تیپ C و توکسین آلفای *C. novyi* و *C. septicum* و *C. chauvoei* انجام شد که OD آن به ترتیب ۰/۷۳۶، ۰/۰۵۶، ۰/۰۳۴ و ۰/۰۷۹ شد. با توجه به این که OD برای توکسین آلفای *C. novyi* و *C. septicum* و *C. chauvoei* کمتر از حد آستانه (cut-off)

خالص‌سازی اثرات سیتوتوکسیک از جمله گرد شدن، ستاره‌ای شکل شدن و واکنش‌شدن سلول‌ها را روی سلول‌های MDCK نشان داد. نتایج کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی ستونی sephadex G100 پیک نشان داد. همچنین نتایج SDS-PAGE حضور توکسین اپسیلون در پیک دوم را تایید کرد. توکسین به دست آمده در این مرحله از خلوص بسیار بالایی برخوردار بود. نتایج کروماتوگرام در مراحل مختلف تخلیص در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ آورده شده است.

نتایج بررسی‌ها نشان داد که کمترین میزان دز کشندگی این توکسین رقت ۱/۸۰۰۰ بود. همچنین مرگ حیوانات نشان دهنده فعالیت توکسین اپسیلون بود در حالی که در گروه کنترل منفی مرگ و میر مشاهده نشد. نتایج تعیین مقدار مطلوب رقت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی جهت انجام آزمایش

جدول ۲- فراکسیون‌های جمع‌آوری شده از مراحل فرایند تخلیص توکسین اپسیلون کلاستریدیوم پرفرینجنز تیپ C

steP	Protein (mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Ammonium sulfate precipitation	۵۶	-	-
CM-Sepharse	۱۰	۳،۷	۶۶،۶ %
DEAE-Cellulose	۰،۴۵	۴۱،۵	۳۳،۳ %
Sephadex-G100	۰،۱۲	۷۷،۸	۱۶،۷ %

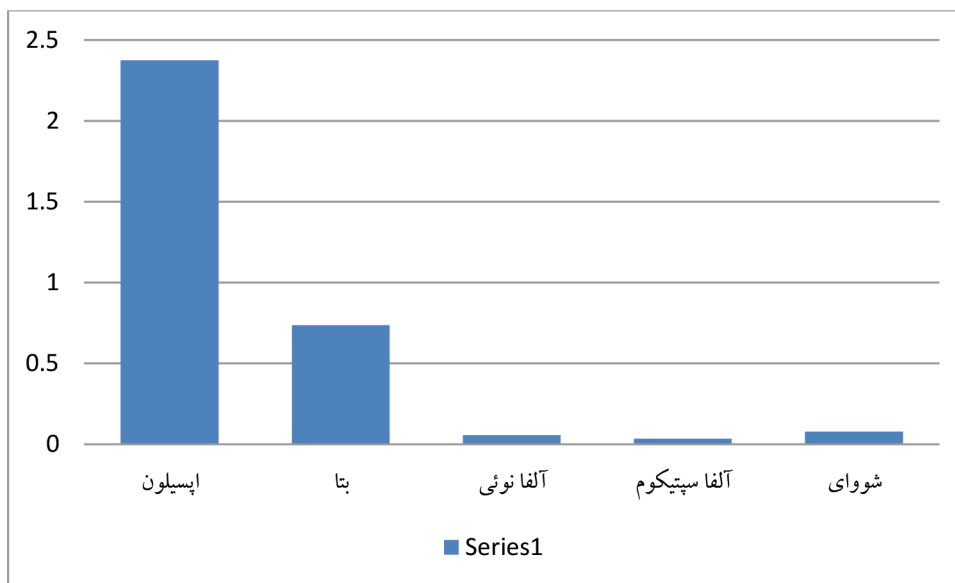


نمودار ۳- کروماتوگرام حاصل از مرحله کروماتوگرافی Sephadex-G100

جدول ۳- تعیین مقدار مطلوب رقت آنتی ژن و آنتی بادی جهت انجام آزمایش الیزا

Negative control		Positive control		Rabbit Serum		Antigen	
رقت	OD	رقت	OD	رقت	OD	رقت	OD
۱:۱۰	۰,۴۱۶	۱:۴۰۰*	۱,۸۳۱	۱:۲۵	۲,۸۶۴	۱:۱۶	OUT
۱:۲۰	۰,۳۷۵	۱:۸۰۰	۱,۷۱۳	۱:۵۰	۲,۶۲۴	۱:۳۲	OUT
*۱:۴۰	۰,۴۳۶	۱:۱۶۰۰	۱,۵۸۰	۱:۱۰۰	۲,۵۵۵	۱:۶۴	۲,۰۵۸
۱:۸۰	۰,۳۵۴	۱:۳۲۰۰	۱,۴۵۰	۱:۱۵۰*	۲,۷۷۱	۱:۱۲۸	۲,۹۵۵
۱:۱۶۰	۰,۳۶۶	۱:۶۴۰۰	۱,۳۴۳	۱:۲۰۰	۲,۵۶۲	۱:۲۵۶	۱,۹۷۶
۱:۳۲۰	۰,۳۹۴	۱:۱۲۸۰۰	۱,۱۷۷	۱:۲۵۰	۲,۵۴۵	۱:۵۱۲	۱,۷۸۹
۱:۶۴۰	۰,۳۰۷	۱:۲۵۶۰۰	۱,۰۲۵	۱:۳۰۰	۲,۵۳۴	*۱:۱۰۲۴	۱,۵۲۴
۱:۱۲۸۰	۰,۳۴۷	-	-	۱:۳۵۰	۲,۴۸۶	۱:۲۰۴۸	۰,۶۶۶
-	-	-	-	۱:۴۰۰	۲,۳۷۴	۱:۴۰۹۶	۰,۴۴۴
-	-	-	-	۱:۴۵۰	۲,۱۳۴	۱:۸۱۹۲	۰,۳۵۵

* : میزان اپتیتم جهت تست الیزا.



فردار ۴- نتایج کراس توکسین اپسیلون با توکسین بتا کلستریدیوم پرفرینجنز، آلفا کلستریدیوم نوای، آلفا کلستریدیوم سپتیکوم و کلستریدیوم شوای

نتایج انحراف معیار آزمون‌های الیزا و SN برای ۲۰ نمونه واکسن تهیه شده در فرماتتور و ۲۰ نمونه واکسن تهیه شده در بن بن در جدول ۶ آورده شده است. ارتباط و ضریب رگرسیون بین SN و الیزا در نمونه‌های مختلف در جداول ۷ و ۸ و نمودارهای ۵ و ۶ آمده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد بین تست الیزا و SN برای نمونه واکسن تهیه شده در فرماتتور ضریب همبستگی متوسطی وجود دارد ($P \leq 0/01$). ($R=0/697$)

گزارش گردید، لذا عدم وجود کراس به اثبات رسید. تنها در مورد توکسین بتا *C.perfringen* تیپ C کمی کراس با توکسین اپسیلون نشان داد. نتایج کراس توکسین اپسیلون با توکسین‌های دیگر کلاستریدیوم پرفرینجنز، نوای، سپتیکوم و شوای در نمودار ۴ آورده شده است.

$$\text{Cut off} = (\text{Mean} + 2\text{SD})$$

$$\text{Cut off} = 2.375 + 2 * 0.104 = 0.42$$

نتایج آزمون SN و الیزا برای نمونه‌های فرماتتور و بن بن به ترتیب در جداول ۴ و ۵ آورده شده است.

جدول ۴ - نتایج آزمون SN و الیزا برای نمونه‌های فرماتتور

نتایج فرماتتور	
SN	الیزا
۶,۰۰۰	۱,۹۶۳
۵,۲۵۰	۱,۸۲۷
۵,۲۵۰	۱,۸۲۲
۶,۲۵۰	۱,۹۴۳
۵,۷۵۰	۱,۸۳۱
۵,۲۵۰	۱,۷۶۹
۵,۵۰۰	۱,۸۳۳
۵,۷۵۰	۱,۸۲۱
۵,۷۵۰	۱,۹۰۶
۵,۵۰۰	۱,۸۰۷
۵,۲۵۰	۱,۷۰۹
۵,۰۰۰	۱,۷۵۲
۵,۵۰۰	۱,۷۴۸
۵,۵۰۰	۱,۹۱۰
۶,۲۵۰	۱,۹۱۵
۵,۵۰۰	۱,۹۵۷
۵,۲۵۰	۱,۸۰۵
۵,۷۵۰	۱,۸۸۶
۵,۲۵۰	۱,۸۵۶
۶,۲۵۰	۱,۹۹۸

بنا به جنبه‌های اخلاقی، اقتصادی و فنی و تعداد زیاد حیوانات مورد استفاده برای تعیین پتنسی واکسن‌های کلستریدیایی باید با روش SN جایگزین گردد. با توجه به روش‌های جایگزین برای آزمایش پتنسی توکسوئیدهای مختلف کلستریدیوم توسعه داده شده و در پیش‌نویس مونوگراف‌های مربوط در پیش‌نویس مقررات مربوطه گنجانده شده است.

واکسن‌های فرمانتوری مورد مطالعه به وضوح استانداردها (یعنی ایمنی مورد نیاز) را برآورده می‌کردند. پتنسی‌های این واکسن‌ها حداقل ۵

همانطور که نتایج نشان می‌دهد بین تست الیزا و سرم نوترالیزاسیون برای نمونه واکسن تهیه شده در بن بن ضریب پایینی وجود دارد ($P \leq 0.01$)، ($R=0.416$).

بحث

اپسیلون توکسین عامل بیماری آنروتوکسمی یا پرخوری *C. perfringens* می‌باشد که به طور طبیعی در خاک و دستگاه گوارش حیوانات وجود دارد. به منظور برنامه‌ریزی اصولی در پیشگیری از بیماری و تنظیم برنامه واکسیناسیون تعیین سطح آنتی‌بادی در حیوان هدف ضروری می‌باشد.

جداول ۵ - نتایج آزمون SN و الیزا برای نمونه های بن بن

نتایج بن بن	
SN	الیزا
۴,۲۵۰	۱,۵۶۷
۵,۰۰۰	۱,۶۷۲
۵,۰۰۰	۱,۷۱۳
۴,۷۵۰	۱,۷۲۵
۴,۲۵۰	۱,۶۴۱
۵,۲۵۰	۱,۶۸۸
۴,۷۵۰	۱,۶۱۰
۴,۵۰۰	۱,۵۹۳
۵,۵۰۰	۱,۶۴۸
۵,۰۰۰	۱,۶۵۹
۴,۰۰۰	۱,۷۰۸
۵,۲۵۰	۱,۷۸۰
۵,۲۵۰	۱,۷۸۰
۴,۷۵۰	۱,۷۵۳
۴,۵۰۰	۱,۷۳۰
۵,۲۵۰	۱,۸۱۹
۵,۲۵۰	۱,۷۲۶
۴,۰۰۰	۱,۵۷۶
۵,۲۵۰	۱,۷۱۵
۴,۲۵۰	۱,۶۲۹

جدول ۶- نتایج انحراف معیار آزمون های الیزا و SN برای نمونه های واکسن تهیه شده در فرمانتور و بن بن

بن بن	بن بن	بن بن	بن بن	فرمانتور	فرمانتور	فرمانتور	فرمانتور	
۰,۳۵۰	۰,۴۹۷	۰,۶۵۸	۰,۴۰۸	۰,۵۸۰	۰,۵۳۰	۰,۵۸۷	۰,۵۳۰	Std. Deviation(SN)
۰,۰۸۳	۰,۰۸۰	۰,۱۲۶	۰,۱۲۲	۰,۱۴۰	۰,۰۳۸	۰,۰۹۱	۰,۱۰۴	Std. Deviation(ELISA)

جدول ۷- ضریب همبستگی بین تست الیزا و SN برای نمونه واکسن تهیه شده در فرمانتور

Correlations			
		Fermenter OD	Fermenter MNT
Fermenter OD	Pearson Correlation	۱	.۶۹۷**
	Sig. (-۲tailed)		.۰۰۰
	N	۴۰	۴۰
Fermenter SN	Pearson Correlation	.۶۹۷**	۱
	Sig. (-۲tailed)	.۰۰۰	
	N	۴۰	۴۰

** . Correlation is significant at the ۰,۰۱ level (-۲tailed).

جدول ۸- ضریب همبستگی بین تست الیزا و SN برای نمونه واکسن تهیه شده به روش دستی (بن بن)

Correlations			
		Bonbon OD	Bonbon MNT
Bonbon OD	Pearson Correlation	۱	.۴۱۶**
	Sig. (-۲tailed)		.۰۰۸
	N	۴۰	۴۰
Bonbon SN	Pearson Correlation	.۴۱۶**	۱
	Sig. (-۲tailed)	.۰۰۸	
	N	۴۰	۴۰

** . Correlation is significant at the ۰,۰۱ level (-۲tailed).

حساسیت و ویژگی این تست در مقابل تست حفاظت موش و کشت به ترتیب ۹۰/۵٪ و ۸۹/۲٪ شد (۷، ۸، ۱۳).

در سال ۱۹۹۷ تکنیک‌های ELISA غیر مستقیم و رقابتی برای شناسایی آنتی‌بادی توکسین اپسیلون *C.perfringen* در سرم بز توسط یوزال مقایسه و بررسی شد. در این پژوهش از کنترل مثبت (رقیق‌سازی سرم هیپرایمیون بز) و کنترل منفی (سرم بزغاله‌های محروم از آغوز) استفاده شد. آنتی‌بادی علیه توکسین اپسیلون در سرم هیپرایمیون نیز با آزمون خنثی‌سازی موش (MNT) اندازه‌گیری شد. ضریب همبستگی بین تکنیک ELISA غیر مستقیم و MNT برابر با ۰/۹۹ و ELISA رقابتی برابر با ۰/۹۸ بود. وی نتیجه‌گیری نمود ELISA غیر مستقیم و رقابتی برای تشخیص آنتی‌بادی اپسیلون سریع، ساده، حساس و اختصاصی عمل می‌نمایند (۲۳). در تحقیق ابرت و همکارانش در سال ۱۹۹۹ بر روی نمونه سرم خرگوش به دو روش در شیشه (in vitro) (الایزای غیر مستقیم و رقابتی) و درون تنی (in vivo) (سرم نوترالیزاسیون موش) انجام شد. نتایج بررسی نشان داد روش‌های برون تنی ویژگی بالا و تکرارپذیری خوبی دارند. علاوه بر این ارتباط خوبی بین تست‌های در شیشه (in vitro) و درون تنی وجود دارد (۶).

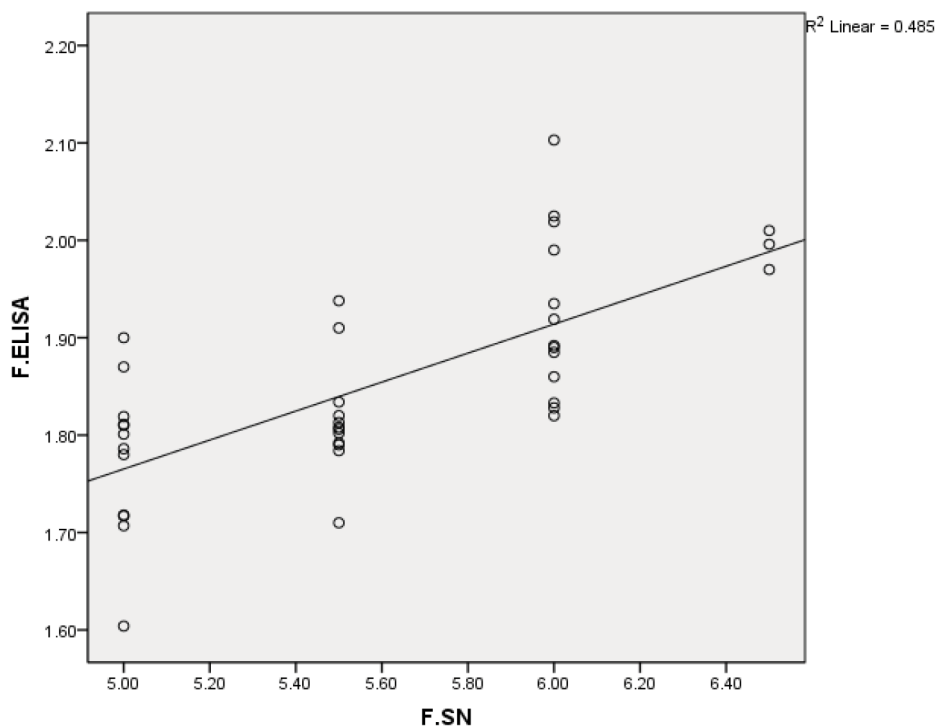
واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر بود. واکنش‌های ساخته شده به روش دستی میزان آنتی‌بادی‌های کمتری را نشان داد که می‌توان نتیجه گرفت که بهینه‌سازی شرایط رشد در فرمانتور به طور مستقیم با افزایش القاء آنتی‌بادی در سرم خرگوش ارتباط دارد و مطالعات اعتبارسنجی قابلیت تکرارپذیری و تکرار آن را تایید کرد.

روش جایگزین برای SN یا (MNT) (Mouse Neutralization Test)، الایزا می‌باشد که برخی از محققین آن را مورد بررسی قرار داده و نتایج مثبتی نیز بدست آمده است.

در بررسی تامسون (۱۹۸۲) بر روی الایزای سرم گوسفند و مقایسه آن با سرم نوترالیزاسیون، همبستگی مشاهده گردید (۲۲).

در سال ۱۹۸۷ نیلور و همکاران در طی یک پژوهش، آزمایش ELISA را به عنوان یک جایگزین برای آزمایش MNT در تشخیص توکسین اپسیلون کلاستریدیوم پرفرینجنز در محتویات روده حیوانات مرده مشکوک به آنتروتوکسمی بررسی نمودند. این آزمایش حساس و کمی بود و با آزمون محافظت از موش‌ها موافقت خوبی داشت (۱۴).

ال ایدریسی و وارد در سال ۱۹۹۲ و مولر و همکاران در سال ۱۹۹۵ بر روی تشخیص آنتروتوکسمی با تست الایزا برآوردی انجام دادند. نتایج



نمودار ۵- نمودار رگرسیون خطی نمونه واکنش تولید شده در فرمانتور

(محور X مقدار SN بر حسب International Unit (IU) و محور Y میزان جذب بر اساس OD)

ارزیابی قرار دادند. نتایج مقایسه بیانگر میزان ایمنی مناسب پس از واکسیناسیون و همبستگی خوب الایزا با MNT بود (۳). همچنین در بررسی باب نشان داده شد که تکنیک الیزا می‌تواند برای تایپینگ جدایه‌های توکسیژنیک *C.perfringen* در شترمرغ استفاده شود (۲).

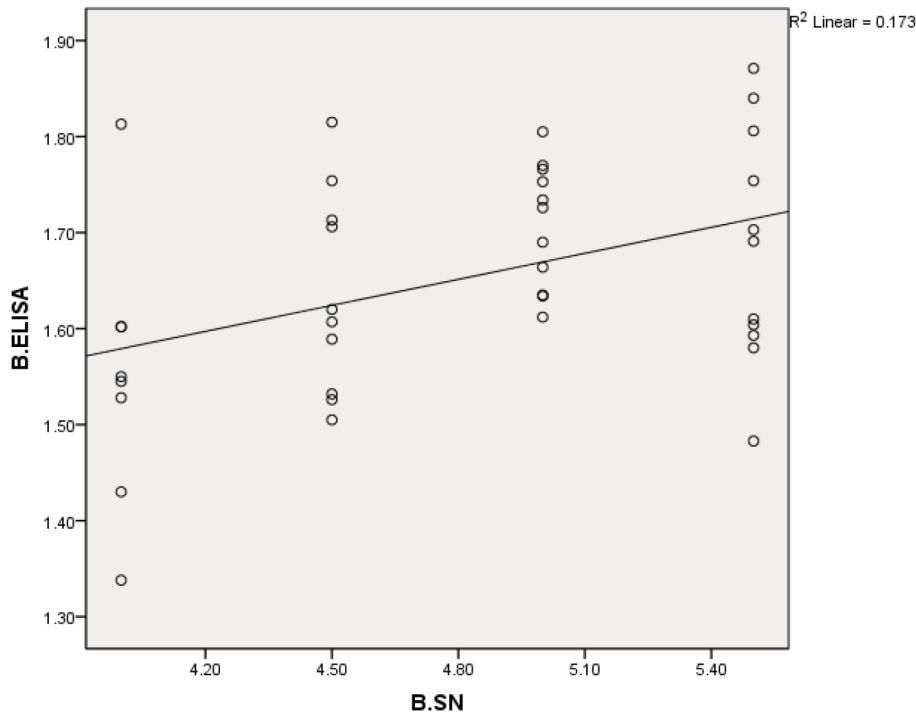
در سال ۲۰۱۷ تحقیقی نیز توسط Feraudet-Tarisse بر روی *C.perfringen* توسط روش‌های ایمنونواسی و ایمنوکروماتوگرافی انجام پذیرفت. نتایج بررسی نشان داد تست‌های ایمنونواسی طراحی شده با حساسیت بالا، برای تحقیقات اپیدمیولوژی مفید می‌باشند (۹). در سال ۱۳۹۲ درخشان و همکاران ۱۲۰ نمونه از محتویات روده کوچک دام‌های مشکوک به بیماری آنترتوکسمی اخذ و تحت آزمایش الایزای غیر رقابتی قرار دادند. پس از انجام آزمایش‌ها و بررسی نتایج، در پنج مورد (۴/۱٪) توکسین‌های آلفا، بتا و اپسیلون تشخیص داده شد و چنین نتیجه گرفتند که تیپ‌های غالب باکتری بیماری‌زا *C.perfringen* تیپ D و سپس تیپ A می‌باشند (۱۰).

نتایج این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین تست الایزا و SN در گروه واکسینه شده‌ها با نمونه واکسن فرماتور وجود دارد و بجای

در سال ۲۰۰۴ آزمایش ELISA رقابتی غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال در موسسه Paul-Ehrlich برای شناسایی آنتی‌بادی علیه توکسین اپسیلون *C.perfringen* توسط ورنر و همکاران ایجاد شد. نتایج به دست آمده دقت متوسط و امکان جایگزینی الایزا با MNT را به طور رضایت‌بخشی نشان داد (۱۸).

در سال ۲۰۰۸ بررسی با هدف مشخص کردن وضعیت آنتی‌بادی‌های ایجاد شده علیه توکسین *C.perfringen* در بز انجام پذیرفت و سطوح آنتی‌بادی در سرم خون بزغاله دو گله مختلف به طور پیوسته برای ۱۴ ماه توسط لین و همکاران با تکنیک الایزای غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفت. در طی تحقیق یکی از این گله‌ها دچار شیوع آنترتوکسمی شد. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی‌های طبیعی دریافت شده علیه توکسین اپسیلون *C.perfringen* در اوایل شش هفته در بزهای جوان ظاهر شده و با افزایش سن و بدون شواهدی از بیماری بالینی افزایش می‌یابند. با شیوع آنترتوکسمی، افزایش قابل توجهی در سطح آنتی‌بادی علیه توکسین ایجاد شد (۲۴).

فلورس و همکاران در سال ۲۰۰۹ تیتراژ قبل و بعد از واکسیناسیون لاماها را توسط الایزای غیر مستقیم و آزمون خنثی‌سازی موش (MNT) مورد



مودار ۶- نمودار رگرسیون خطی نمونه واکسن تولید شده به روش دستی (بن بن)

(محور X مقدار SN بر حسب International Unit (IU) و محور Y میزان جذب بر اساس OD

types. *Journal of Veterinary Laboratory Research* 4: 131.

11- Lowry, O., J. Rosebrough, A. Farr and R. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of biological chemistry* 193: 265-275.

12- Miyata, S., O. Matsushita, J. Minami, S. Katayama, S. Shimamoto and A. Okabe. 2001. Cleavage of a C-terminal peptide is essential for heptamerization of *Clostridium perfringens* ϵ -toxin in the synaptosomal membrane. *Journal of Biological Chemistry* 276: 13778-13783.

13- Møller, K., P. Ahrens and A. Meyling. 1995. Comparison of toxicity neutralization, ELISA, and PCR tests for typing of *Clostridium Perfringens* and for detection of the enterotoxin gene, abstr. B16. International Conference on the Molecular Genetics and Pathogenesis of the Clostridia. P. 23.

14- Naylor, R., P. Martin and R. SharPe. 1987. Detection of *Clostridium perfringens* epsilon toxin by ELISA. *Research in veterinary science* 42: 255-256.

15- Niilo, L., R. E. Moffatt and R. Avery. 1963. Bovine "Enterotoxemia". II. Experimental reproduction of the disease. *The Canadian Veterinary Journal* 4: 288.

16- Rahman, P., L. Rahman, H. Razieh, P. Reza and G. Shamsedin. 2014. Detection and determination of various types of *Clostridium perfringens* in sheep and goat by culture and ELISA method in Khuzestan province. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5: 32-40.

17- Rickwood, D. and B. D. Hames. 1990. Gel electrophoresis of proteins: A practical approach. *Irl Press*.

18- Roskopf-Streicher, U., P. Volkers and E. Werner. 2003. Control of *Clostridium perfringens* vaccines using an indirect competitive ELISA for the epsilon toxin component. *Pharmeuropa bio* 2: 91-96.

19- Shortt, S., R. Titball and C. Lindsay. 2000. An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D ϵ -toxin in human and animal cells. *Human & experimental toxicology* 19: 108-116.

20- Smith, D. 1986. The Pathogenic Anaerobic Bacteria. *Clostridium perfringens*. Chapter 7. Charles Thomas Publisher. Spring field. USA.

21- Subramanyam, K., V. Rao, S. Vijayakrishna and R. MVS. 2000. Purification of epsilon toxin of *Cl. Perfringens* type D by de-ae-cellulose chromatography. *Indian Veterinary Journal* (India).

22 - Thomson, R. V. 16-18 november 1982. Quantitation of ovine *Cl. perfringens* epsilon and tetanus antitoxin by Enzyme immunoassay. IVth symposium of the commission for the study of animal diseases caused by anaerobes. Paris.

تست SN در این موارد می‌توان از الیزا استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

الیزا به عنوان تستی مناسب برای مطالعات اپیدمیولوژی پیشنهاد می‌شود که ایمنی واکسن را در حیوان آزمایشگاهی ارزیابی می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از پرسنل بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی که در مراحل مختلف پروژه همکاری نموده اند تشکر می‌کنند.

منابع مورد استفاده

- 1- Ardehali, M. and H. Dowran. 1973. Preparation of standard clostridial antitoxins in sheep. *Arch Razi Inst* 25: 17-21.
- 2 - Babe, T., B. Jafari and S. Bahmanpour. 2012. Typing of toxigenic isolates of *Clostridium perfringens* by ELISA in ostrich. *African Journal of Microbiology Research* 6: 1766-1769.
- 3- Bentancor, A. B., P. Halperin, M. Flores and F. Iribarren. 2009. Antibody response to the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* following vaccination of Lama glama crias. *The Journal of Infection in Developing Countries* 3: 624-627.
- 4- Bhowan, A. S. and A. Habeeb. 1977. Structural studies on ϵ -prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to ϵ -toxin. *Biochemical and biophysical research communications* 78: 889-896.
- 5- British Pharmacopoeia. 2017. *Clostridium Perfringens*. *Vet*: 229-231.
- 6- 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.
- 7- El Idrissi, A. H. and G. E. Ward. 1992. Development of double sandwich ELISA for *Clostridium perfringens* beta and epsilon toxins. *Veterinary microbiology* 31: 89-99.
- 8- El Idrissi, A. H. and G. E. Ward. 1992. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxemias. *Veterinary microbiology* 31: 389-396.
- 9- Féraudet-Tarisse, C., C. Mazuet, S. Pauillac, M. Krüger, C. Lacroix, M. R. Popoff, B. G. Dorner, O. Andréoletti, M. Plaisance and H. Volland. 2017. Highly sensitive sandwich immunoassay and immunochromatographic test for the detection of Clostridial epsilon toxin in complex matrices. *PLoS one* 12: e0181013.
- 10- Hasani Derakhshan, M., M. Amini, M. Ali molaei, A. Jabbari, M. Shamsadini, M. Ezzatkhan and M. Mosavi. 1391. The use of ELISA (ELISA) in the detection of *Clostridium perfringens* toxino-

- 23- Uzal, F. A., K. Nielsen and W. Kelly. 1997. Detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA. *Veterinary microbiology* 57: 223-231.
- 24- Veschi, J. L. A., O. A. Bruzzone, D. M. Losada-Eaton, I. S. Dutra and M. E. Fernandez-Miyakawa. 2008. Naturally acquired antibodies against *Clostridium perfringens* epsilon toxin in goats.

Veterinary immunology and immunopathology 125: 198-202.

- 25- Zayerzadeh, E., A. R. Jabbari, M. K. Koochi, G. Sadeghi Hashjin, Z. Ghasempourabadi and A. Fardipour. 2015. Purification of epsilon toxin from vaccinal strain of *Clostridium perfringens* type D using ion exchange chromatography and gel filtration. *Iranian Veterinary Journal* 11: 92-103.

