DOI: 10.22092/vj.2019.126358.1585 شماره ۱۲۸ پاییز ۱۳۹۹

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

عیارسنجی آنتی توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D در سرم خرگوش به روش الایزای غیر مستقیم

• علیرضا پردیس (نویسنده مسئول)

بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتریایی بی هوازی، آزمایشگاه تحقیقاتی کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی 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 سرم‌سازی 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 توکسین‌های قوی کلستریدیایی و توکسین اصلی تیپ‌های B و D و عامل بیماری گاز گانگرن درانسان و آنتروتوکسمی در دام است. ارزیابی ایمنی ناشی از واکسن که در پیشگیری از این بیماری از اهمیت خاصی برخودار بوده که در فارماکوپه روش SN (Serum neutralization test) برای آن پیشنهاد گردیده است. هدف این پژوهش ارزیابی تست الایزا به عنوان روشی جایگزین برای اندازگیری آنتی‌توکسین اپسیلون می‌باشد. ابتدا تست اندازه‌گیری توانایی واکسن به روش معمول انجام یافته و سرم‌های اخذ شده با هر دو روش معمول و الایزای غیرمستقیم بررسی گردید. میزان cut off کنترل منفی در تست الایزا ۰/۴۲ برآورد شد و نتایج آزمون کراس نشان داد که سیستم الایزا برای توکسین اپسیلون اختصاصی عمل می‌نماید نتایج این پژوهش ارتباط معنی‌داری 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 الایزا 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: الایزای غیر مستقیم- واکسن آنتروتوکسمی- کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ D- آنتی توکسین اپسیلون- serum neutralization test

www.SID.ir

Archive of SID

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

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 ویرولانس 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 پلی والان 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 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 تیتر 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-Sepharose، کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE-Cellulose و ژل فیلتراسیون Sephadex-G100 تهیه شد که می‌توان از این توکسین جهت کوتینگ آنتی ژن و تولید آنتی‌توکسین اپسیلون استفاده نمود (۲۵). هدف از این پروژه

www.SID.ir

Archive of SID

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

مواد و روش‌کار

روش مطالعه از نوع مداخله‌ای و به شیوه کارآزمایی بالینی می‌باشد و ایمنی‌زایی واکسن به روش الایزا 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 سانتریفوژ و الایزا 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 الایزا 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.

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).

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه توکسین اپسیلون

کشت باکتری کلستریدیوم 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- سیستئین، پودر جگر، نمک، تامپون، تیکه گوشت و تریس ویتامین می‌باشد. تریس ویتامین حاوی ویتامین‌های بیوتین، تیامین، نیکوتینیک اسید، پیریدوکسین و ویتامین B۱۲ 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) ۱۰۰IU/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 ۴۰۰۰rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ 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 g از رسوب سوسپانسیون تهیه نموده سپس رقت‌های مختلف۱/۱۰۰ تا ۱/۱۰۰۰ را تهیه و هر رقت (نیم میلی‌لیتر) به دو موش به صورت داخل وریدی تزریق شد. آخرین رقتی که باعث مرگ موش ها شده به عنوان نتیجه تست MLD گزارش شد (۱۵).

سپس تست پتنسی و الایزا به موازات هم بر روی این سرم‌ها انجام و نتایج ثبت شد.

مراحل تست پتنسی

۱- آماده سازی محلول توکسین: ابتدا یک میلی‌گرم پودر توکسین را در یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (PH=۷) حل نموده (۱mg/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- آماده‌سازی محلول آنتی‌توکسین استاندارد: پودر آنتی‌توکسین استاندارد خریداری شده از (شرکت Weybridge انگلستان) را در نرمال سالین و گلیسیرین به نسبت ۳۰ به۷۰ 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 ۰/۹، ۰/۷، ۰/۵، ۰/۳ و ۰/۱ از آنتی‌توکسین استاندارد با یك 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 الایزا (تهیه Checkerboard)

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

محلول توکسین اپسیلون توسط بافر کربنات با رقت ۱/۱۰۲۴ تهیه گردیده سپس۵۰ میکرولیتر از آن در چاهك‌های 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 1X و توئین ۲۰) شسته شد و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول BSA ۱٪ (۰/۰۱µg/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 میکرولیتراز نمونه سرم‌های مختلف داخل ردیف‌های A1-12 ریخته شد. همچنین ۵۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌کننده (محلولی از PBS 1X و BSA ۱٪) داخل تمام چاهک‌ها به جزء A1-12 ریخته شد . ۵۰ میکرولیتر از چاهک‌های ردیف A1-12 s برداشته داخل چاهک‌های ردیف B1-12 ریخته و کاملا پیپتاژ نموده و داخل چاهک‌های C1-12 ریخته شد. همین عمل را برای ردیف‌های

www.SID.ir

Archive of SID

بعدی انجام داده و در نهایت ۵۰ میکرولیترآخری 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 الایزا ریدر(شرکت Biotek) در طول موج ۴۵۰ نانومتر OD (جذب نوری) را خوانده و نتایج مورد آنالیز قرار گرفت (۱۶) .

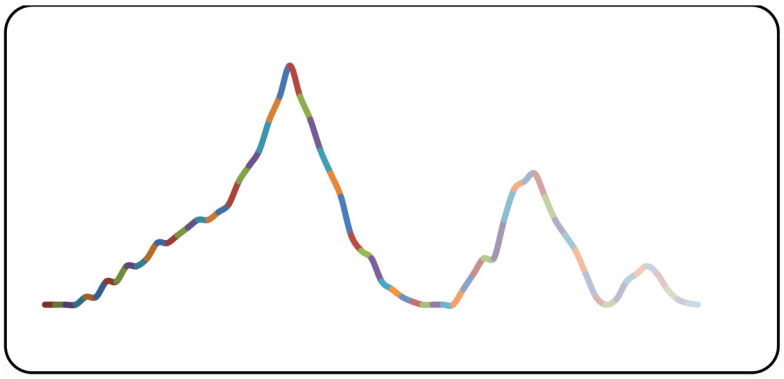
تیتر الایزا مطابق فرمول زیر محاسبه گردید.

رقت سرم × (آنتی‌ژن + کونژوگه) OD زمینه - OD نمونه=محاسبه تیتر الایزا

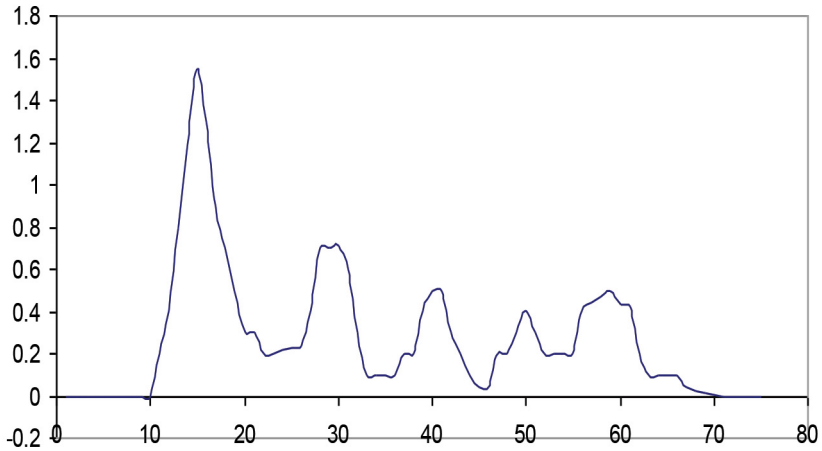
معنی‌دار بودن (P value) نتایج روش SN با ELISA با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS با محاسبه ضریب همبستگی (R) مقایسه گردید.

نتایج

نتایج بررسی توکسین اپسیلون در کشت سلول در تمامی مراحل



نمودار ۱ - کروماتوگرام مرحله کروماتوگرافی CM-Sepharose



نمودار ۲- کروماتوگرام مرحله کروماتوگرافی DEAE-Cellulose

www.SID.ir

Archive of SID

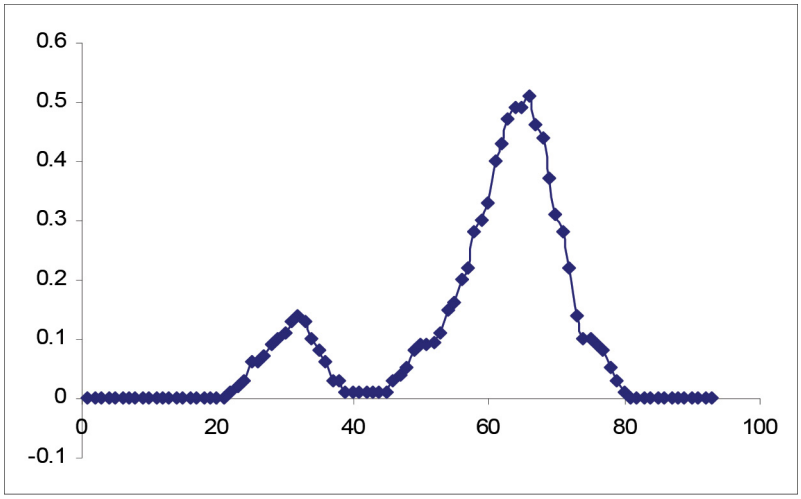
خالص‌سازی اثرات سیتوتوکسیک از جمله گرد شدن، ستاره‌ای شکل شدن و واکوئله‌شدن سلول‌ها را روی سلول‌های MDCK نشان داد.
نتایج کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی ستونی sephadex G100 دو پیک نشان داد. همچنین نتایج SDS-PAGE حضور توکسین اپسیلون در پیک دوم را تایید کرد. توکسین به دست آمده در این مرحله از خلوص بسیار 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 الایزا در سرم خرگوش‌های واکسینه شده، 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)

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

steP	Protein (mg)	Purification (fold)	Yield (٪)
Ammonium sulfate precipitation	۵۶	-	-
CM-Sepharose	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

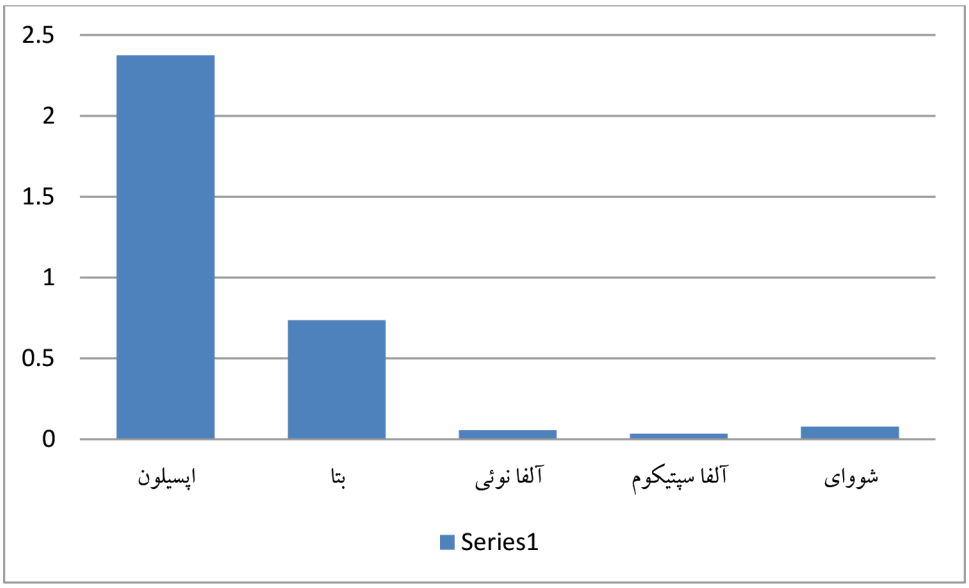
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳-تعیین مقدار مطلوب رقت آنتی‌ژن و آنتی بادی جهت انجام آزمایش الایزا

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 اپتیمم جهت تست الایزا.



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

www.SID.ir

Archive of SID

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 کلستریدیوم پرفرینجنز، نوای، سپتیکوم و شوای در نمودار ۴ آورده شده است.

Cut off = (Mean+ 2SD)

Cut off = 2.375+ 2 * 0.104= 0.42

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

نتایج انحراف معیار آزمون‌های الایزا و SN برای ۲۰ نمونه واکسن تهیه شده در فرمانتور و ۲۰ نمونه واکسن تهیه شده در بن بن در جدول ۶ آورده شده است.

ارتباط و ضریب رگرسیون بین SN و الایزا در نمونه سرم‌های مختلف در جداول ۷ و ۸ و نمودارهای ۵ و ۶ آمده است.

همانطور که نتایج نشان می‌دهد بین تست الایزا و SN برای نمونه واکسن تهیه شده در فرمانتور ضریب همبستگی متوسطی وجود دارد ($P\leq ۰/۰۱$). ($R=۰/۶۹۷$).

جدول ۴ - نتایج آزمون SN و الایزا برای نمونه های فرمانتور

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

www.SID.ir

Archive of SID

همانطور که نتایج نشان می دهد بین تست الایزا و سرم نوترالیزاسیون برای نمونه واکسن تهیه شده در بن بن ضریب پایینی وجود دارد ($P\leq ۰/۰۱$)، ($R=۰/۴۱۶$).

بحث

اپسیلون توکسین عامل بیماری آنتروتوکسمی 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.

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

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

جدول ۷- ضریب همبستگی بین تست الایزا 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 الایزا 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).

www.SID.ir

Archive of SID

واحد بین‌المللی در هر میلی‌لیتر بود. واکسن‌های 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.

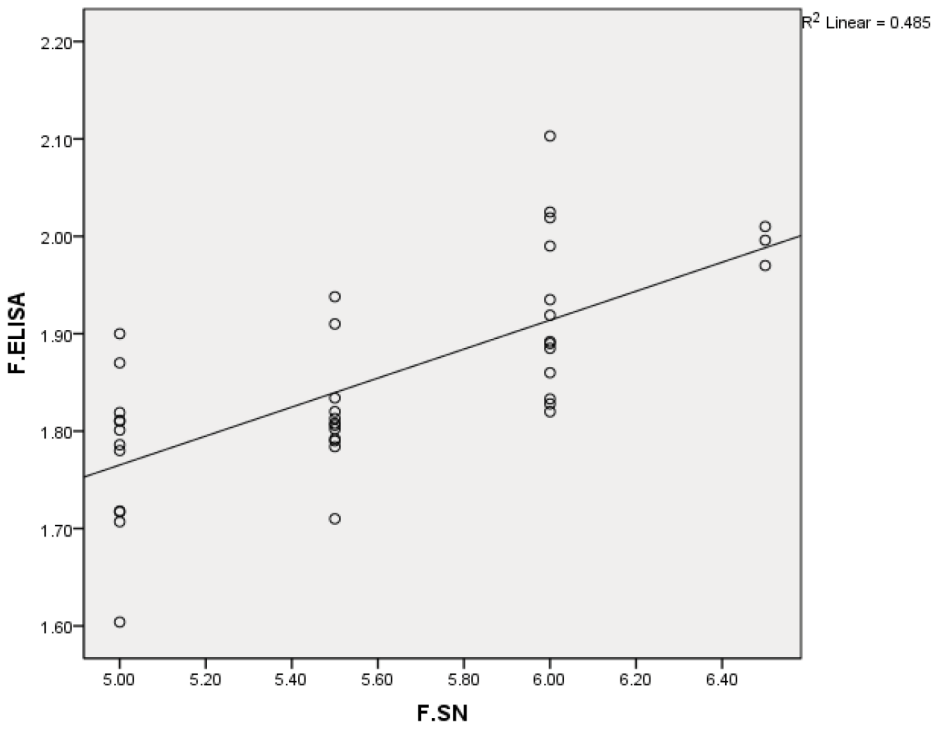
در بررسی تامسون (۱۹۸۲) بر روی الایزای سرم گوسفند و مقایسه آن با سرم نوترالیزاسیون، همبستگی مشاهده گردید (۲۲).

در سال ۱۹۸۷ نیلور و همکاران در طی یک پژوهش، آزمایش ELISA را به عنوان یک جایگزین برای آزمایش MNT در تشخیص توکسین اپسیلون کلستریدیوم 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 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 ۱۹۹۷تکنیک‌های 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 غیرمستقیم 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).



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

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

www.SID.ir

Archive of SID

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 آنتروتوکسمی 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 آنتروتوکسمی، افزایش قابل توجهی در سطح آنتی‌بادی علیه توکسین ایجاد شد (۲۴).

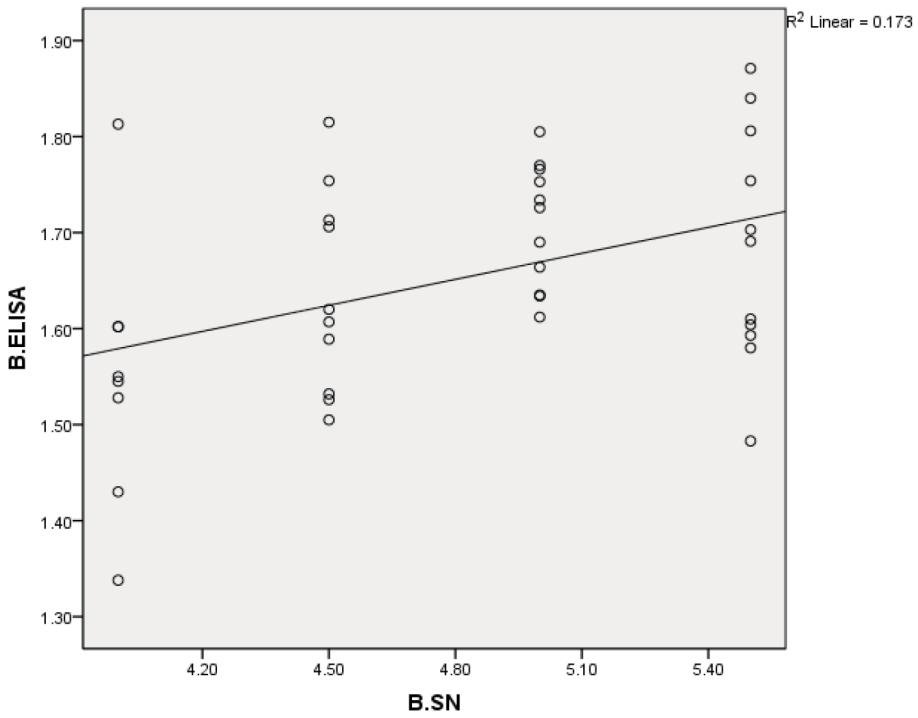
فلورس و همکاران در سال ۲۰۰۹ تیتر قبل و بعد از واکسیناسیون لاماها را توسط الایزای غیر مستقیم و آزمون خنثی‌سازی موش (MNT) مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مقایسه بیانگر میزان ایمنی مناسب پس از واکسیناسیون و همبستگی خوب الایزا با MNT بود (۳).

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 ایمونواسی و ایمونوکروماتوگرافی انجام پذیرفت. نتایج بررسی نشان داد تست‌های ایمونواسی 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 آنتروتوکسمی اخذ وتحت 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 می باشند (۱۰).

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



نمودار 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

www.SID.ir

Archive of SID

تست SN در این موارد می‌توان از الایزا استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

الایزا 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- Bhown, 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. Lacroux, 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. Shamsaddini, M. Ezzatkhah and M. Mosavi. 1391. The use of ELISA (ELISA) in the detection of *Clostridium perfringens* toxino-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- Rosskopf-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 *Clostridiurn 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 deae-cellulose charomatography. *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.

www.SID.ir

Archive of SID

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. Koohi, 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.

www.SID.ir