DOI: 10.22092/vj.2019.127798.1619
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

طراحی یک روش الایزای غیرمستقیم جهت عیار سنجی آنتی توکسین بتا کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C در سرم خرگوش

• لیدا عبدالمحمدی خیاو (نویسنده مسئول)
بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
•علیرضا پردیس
بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
• علی حق روستا
بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی‌هوازی، کلستریدیا، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۲۸-۰۶-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش:۰۹-۰۹-۱۳۹۸
Email: mohammadimail1396@gmail.com

چکیده

کلستریدیوم پرفرینجنز عامل بیماری انتروتوکسمی می باشد که با ضرر و زیان شدید اقتصادی همراه است. ارزیابی ایمنی ناشی از واکسن در پیش گیری از این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است که به روش سرم نوترالیزاسیون انجام می شود. ولی به دلیل معایب آن، روش جایگزین الایزا در این طرح پیشنهاد گردید. در این تحقیق، پس از تهیه توکسین بتا و تخلیص آن، مقدار MLD و غلظت پروتئین آن به روش لوری محاسبه گردید. همچنین آنتی سرم کنترل مثبت، کنترل منفي و آنتی سرم از نمونه ها آماده سازی گردید. سپس آزمون الایزا (درون شیشه) و پتنسی (سرم نوترالیزاسیون) (درون تنی) به موازات هم انجام و نتایج با نرم افزار SPSS آنالیز گردید. میزان cut off کنترل منفی در آزمون الایزا ۰/۴۳۵ برآورد شد و در آزمون کراس مشخص گردید که الایزا براي شناسايي توکسین بتا اختصاصي عمل مي نماید و میزان تکرار پذیري آن با استفاده از انحراف معیار ارزیابي گردید (برای نمونه حد متوسط SD = ۰/۰۳۳ و CV = ۷/۲۵). نتایج این بررسی نشان داد ارتباط معنی داری از نظر آماری بین دو آزمون درون تنی و درون شیشه، در نمونه سرم خرگوشهای واکسینه با واکسن انتروتوکسمی وجود دارد. آنالیز رگرسیون خطی، همبستگی ۰/۸۴ با P≤۰/۰۱ را نشان داد. حساسیت، ارزش پیشگویی مثبت و منفی آزمون الایزا در این نمونه ها به ترتیب ۱۰۰٪، ۸۴/۲۱ و ۱۰۰٪ محاسبه گردید. در نهایت پیشنهاد گردید از الایزا به عنوان جایگزین تست سرم نوترالیزاسیون برای ارزیابی واکسن انتروتوکسمی در خرگوش استفاده نمود. اگرچه برای استفاده در حیوانات هدف نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C ، آنتی توکسین بتا، سرم نوترالیزاسیون، الایزا، واکسن تترا والان انتروتوکسمی

● Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 21-30

Designing of an Indirect ELISA Method for the Detection of Beta Antitoxin of *Clostridium perfringens* Type C in Rabbit Serum

By: Abdolmohammadi khiav, L., (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. Paradise, A.R., 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 Hagh Roosta, A., 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: 2019-09-19 Accepted: 2019-11-30

Email: mohammadimail1396@gmail.com

Clostridium perfringens is the causative agent of enterotoxaemia, which is related to severe economic losses. The evaluation of immunity of beta antitoxin, that prevented animals against the disease, is measured using potency (serum neutralization) technique that it has disadvantages. So Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) has been proposed as an alternative to SN. In this research, before and after purification of beta toxin, MLD and amount of protein was measured using Lowry method. Then, positive and negative control antiserum and samples antiserum were prepared. Then, we were measured beta antitoxin by ELISA and serum neutralization simultaneously and the results were analyzed by SPSS software.

The negative control cut-off was calculated 0.485 and cross-examination was shown that beta toxin used in this study has no cross reaction with other toxins of *Clostridium perfringens* and its repeatability was assessed using standard deviation (for Medium specimen: SD=0.033 CV=7.25) The results of this study showed that there is a significant agreement between in vivo and in vitro tests for serum samples of vaccinated rabbits by enterotoxaemia vaccine. Linear regression analysis gave correlation coefficients of 0.84 for the indirect ELISA, with a significance level of P<0.01. Sensitivity, positive and negative predictive value of ELISA in these samples was 100%, 84.21% and 100%, respectively. Finally, ELISA systems are suitable candidates to replace the MNT used for detection antibody in laboratory animals. However, further research in this field is needed for target animals.

Key words: *Clostridium perfringens* type C, beta antitoxin, serum neutralization, ELISA, tetravalent enterotoxaemia vaccine

مقدمه

کلستریدیوم پرفرینجنز که عموما جایگاه آن در خاك و روده انسان و حیوان می‌باشد، عامل بیماری‌های مختلف در دام از جمله انتروتوکسمی، قلوه نرمی، اسهال عفونی بره‌های نوزاد، استراک و آنتریت هموراژیک می‌باشد. این باکتری چهار توکسین اصلی اپسیلون بتا یوتا و آلفا و تعدادی توکسین فرعی تولید می‌نماید. این باکتری بر اساس توکسین‌های اصلی به پنج تیپ A تا E تقسیم‌بندی می‌شود. تیپ‌های B و C عامل انتروتوکسمی حاوی فاکتورهای ویرولانس مختلف بوده (۲۰) یکی از مهم‌ترین این فاکتورها بتا توکسین می‌باشد.

اولین بار در سال ۱۹۹۳ توکسین بتا کلستریدیوم پرفرینجنز سویه NCTC853 از لحاظ ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت و توالی نوکلئوتیدی ژن آن (cpb) مشخص و با آزمایش هیبریداسیون DNA مشخص گردید که این ژن فقط در تیپ‌های B و C وجود دارد. مطالعات سعید و گورجار نشان داد که *cpb*B و *cpb*C بر روی پلاسمیدهایی با وزن ۶۵ تا ۱۱۰ کیلو باز قرار دارند (۸، ۱۹) ژن *cpb* بر روی ژنوم باکتری کلستریدیوم پرفرنجنز تیپ C یک پروتوکسین ۳۳۶ آمینو اسیدی را کد می‌کند. این

پروتئین دارای یک سکانس سیگنالی ۲۷ آمینو اسیدی می‌باشد که این سکانس در خلال ترشح پروتئین حذف می‌شود و در نهایت یک پروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۵ کیلو دالتون تولید می‌شود. توکسین بتا در موقعیت ۲۶۵ دارای اسید آمینه سیستئین می‌باشد. این توکسین بوسیله عوامل تغییردهنده گروه تیول غیر فعال می‌شود. به همین دلیل نسبت به آنزیم‌های پرتئولیتیك (مخصوصا تریپسین) بسیار حساس است و تخریب می‌شود. توکسین بتا به پروتئین‌های متصل به گانگلیوزیدها باند می‌شوند و ایجاد منفذ می‌کنند و با ایجاد کانال باعث تورم و لیز سلول می‌شود (۱۸, ۲۳).

تحت تاثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی می‌توان توکسین بتا را به توکسوئید تبدیل نمود. واکسن پلی‌والان انتروتوکسمی ساخت موسسه واکسن و سرم سازی رازی شامل پیکره کشته و توکسوئیدهای باکتری است که طی دو تزریق به فاصله ۴ هفته موجب ایمنی بر علیه این توکسین در دام‌ها می‌شود. ارزیابی ایمنی ناشی از واکسن در پیش‌گیری از این بیماری از اهمیت خاصی برخودار است که به روش سرم نوترالیزاسیون انجام می‌شود. ولی این روش استاندارد دارای معایبی می‌باشد. روش جایگزین درون شیشه پیشنهاد شده آزمون الایزا می‌باشد. بنابراین برای راه‌اندازی این تکنیک در چندین مرحله تلاش‌های زیادی توسط محققین صورت گرفت. در سال ۱۳۹۱ توکسین بتا از کلستریدیوم پرفرنجنز تیپ C با استفاده از تکنیک‌های مختلف کروماتوگرافی و ژل فیلتراسیون تهیه شد که می‌توان از این توکسین جهت کوتینگ آنتی‌ژن و تولید آنتی‌توکسین بتا استفاده نمود (۲۴).

هدف از این پروژه طراحی روش الایزای غیرمستقیم جهت اندازه‌گیری آنتی توکسین بتا کلستریدیوم پرفرینجنز تیپ C در سرم خرگوش و مقایسه دو روش الایزا و پتنسی توسط نرم‌افزار آماری SPSS می‌باشد. با انجام این تحقیق ابزار موثری برای انجام مطالعات بعدی از جمله بررسی ایمنی‌زایی واکسن در حیوانات هدف و تشخیص سریع موارد مشکوك بیماری فراهم خواهد شد که گامی موثر جهت کنترل بیماری در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌کار

روش مطالعه از نوع مداخله‌ای و به شیوه کارآزمایی بالینی می‌باشد و ایمنی‌زایی آن توسط آزمون الایزا اندازه‌گیری گردید.

مراحل انجام این پروژه شامل تهیه توکسین بتا، تهیه آنتی‌سرم کنترل مثبت، منفی و نمونه‌های آزمون، انجام آزمون الایزا و پتنسی و آنالیز نتایج با نرم‌افزار SPSS می‌باشد.

تهیه توکسین بتا

کشت باکتری کلستریدیوم پرفرنجنز تیپ C

جهت کشت باکتری، آمپول لیوفیلیزه حاوی باکتری کلستریدیوم پرفرنجنز تیپ C (CN ۳۰۱) را باز نموده و در محیط کشت جگر گوساله و سپس محیط عصاره جگر و در نهایت در محیط کشت مخصوص توکسین‌زایی (جهت تهیه توکسین) کشت داده شد، سپس تست MLD (جهت تعیین میزان قدرت کشندگی) انجام گردید. کشت باکتری به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی قرار داده شد (Anoxomat). محیط کشت مخصوص توکسین‌زایی شامل پپتون، عصاره مخمر، ال- سیستئین، پودر جگر، نمک، تامپون، تیکه گوشت و ویتامین‌های بیوتین، تیامین، نیکوتینیک اسید، پیریدوکسین و ویتامین B12 و عناصر معدنی سولفات آهن، سولفات مس، سولفات روی، سولفات منیزیم و کلرید منگنز می‌باشد. برای بررسی میزان کشندگی توکسین بتا پس از سانتریفوژ (Eppendorf) به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۴۵۰۰ از رسوب توسط سرم فیزیولوژی سوسپانسیون تهیه نموده سپس رقت‌های مختلف را تهیه و هر رقت (۰/۵ میلی‌لیتر) به دو موش به صورت داخل وریدی تزریق شد. آخرین رقتی که باعث مرگ موش‌ها شده به عنوان نتیجه تست MLD (حداقل دوز کشندگی) گزارش شد. سپس مراحل خالص‌سازی توکسین بتا انجام شد.

ترسیب با استفاده از نمک آمونیوم سولفات و دیالیز

جهت ترسیب از نمک آمونیوم سولفات (مرک) ۵۰٪ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد استفاده شد و به مدت ۲۴ ساعت در سردخانه قرار داده شد. سپس محلول حاوی آمونیوم سولفات به مدت ۴۵ دقیقه در g ۴۵۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردیده و مایع‌رویی دور ریخته شد. رسوب از ته ظرف جمع‌آوری گردیده و درون کیسه دیالیز (سیگما) به همراه ۲۰ میلی‌لیتر از محلول بافر تریس هیدروکلراید ۶= PH ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در سردخانه قرار داده شد. محلول کیسه دیالیز به مدت ۴۵ دقیقه در g ۴۵۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس سوپرناتانت از فیلترسرسنگی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. توکسین آلفا توسط آنتی‌توکسین آلفا خنثی گردید. جهت تائید خنثی گشتن توکسین آلفا، ۰/۲ میلی‌لیتر از این محلول را به صورت داخل جلدی به دو خوکچه هندی تزریق نموده و حیوانات به مدت ۲۴ ساعت تحت نظر گرفتند. سپس با استفاده از ستون کروماتوگرافی G۵۰ و متعاقبا DEAE توکسین بتا تهیه گردید. سپس بر روی نمونه خام و نمونه‌های تخلیص شده پروتئین سنجی و MLD (جهت سنجش میزان کشندگی توکسین) انجام و نمونه‌ها در فریزر ۲۰ – درجه نگه‌داری شدند.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

میزان پروتئین به روش "پروتئین‌سنجی لوری" با تهیه رقت‌های مختلف توکسین بتا و پروتئین استاندارد BSA (1mg/ml) با رقت‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ و افزودن محلول‌های مختلف و معرف فولین انجام و محاسبه گردید (۱۱).

تهیه آنتی‌سرم کنترل مثبت

سوسپانسیون واکسن انترتوکسمی همراه با ادجوانت کامل فروند تهیه وجهت ایمن‌سازی به میزان سه میلی‌لیتر به صورت زیر جلدی به ناحیه پشت گردن ۱۰ خرگوش سه تا چهار ماهه (وزن تقریبی ۳ کیلوگرم) تزریق گردید. تزریق دوم و سوم پس از ۲۸ و ۵۶ روز با ادجوانت ناقص فروند به همان صورت تکرار گردید. ۱۴ روز پس از تزریق سوم از قلب خرگوش خونگیری و سرم‌ها جمع‌آوری شدند. سرم‌ها تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

تهیه آنتی‌سرم‌های نمونه

۳ میلی‌لیتر از هر نمونه واکسن انتروتوکسمی بدون ادجوانت به صورت

زیر جلدی در ناحیه پشت گردن ۱۰ خرگوش تزریق گردید. پس از ۲۸ روز تزریق دوم، به همان صورت تکرار شد. ۱۴ روز پس از تزریق دوم از قلب خرگوش‌ها خون‌گیری شد و سرم آن‌ها جدا گردیدند.

تهیه آنتی‌سرم کنترل منفی

از یک گروه خرگوش‌های غیر واکسینه، جهت تهیه آنتی‌سرم کنترل منفی خون‌گیری بعمل آمد و سرم جدا گردید.
سپس تست پتنسی و الایزا به موازات هم بر روی این سرم‌ها انجام و نتایج ثبت گردیدند.

مراحل تست پتنسی

۱- آماده‌سازی محلول توکسین و انجام تست دوز: یک میلی‌گرم پودر توکسین را در ۱۰۰۰ میکرولیتر 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 Naval Medical Research Institute (N.M.R.I) ۲۲-۱۷ گرم به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به صورت داخل وریدی در ناحیه دم تزریق گردید. آخرین رقت مرگ و میر، به عنوان نتیجه تست دوز ثبت گردید.
۲- آماده‌سازی محلول آنتی‌توکسین استاندارد: پودر آنتی توکسین استاندارد) شرکت Weybridge انگلستان (را در سرم فیزیولوژی و گلیسیرین (فلوکا) به نسبت ۳۰ به۷۰ حل نموده سپس با سرم فیزیولوژی رقیق نموده تا رقت ۱ IU/ml تهیه گردد.
۳- تهیه آنتی‌سرم‌های نمونه و کنترل مثبت از خرگوش‌های واکسینه و آنتی سرم کنترل منفی از خرگوش‌های غیر واکسینه.
۴- تهیه محلول‌ها برای تزریق: نسبت‌های مختلف (۰/۹، ۰/۷، ۰/۵، ۰/۳ و ۰/۱) از آنتی‌توکسین استاندارد با ۱۰۰۰ میکرولیتر از توکسین مخلوط گردید. همین عمل برای آنتی‌سرم خرگوش انجام گردیده و با سرم فیزیولوژی به حجم دو میلی‌لیتر رسید. سپس لوله‌ها را به مدت نیم ساعت در دمای اتاق قرار داده تا نوترالیزاسیون بین توکسین و آنتی‌توکسین انجام شود. در نهایت هر رقت به دو موش به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به صورت داخل وریدی در ناحیه دم تزریق گردید. با مقایسه آخرین رقت موش تلف شده در آنتی‌توکسین استاندارد و آنتی‌سرم خرگوش، میزان آنتی‌توکسین بتا بر حسب واحد بین‌الملل محاسبه شد (۳).
رقت آنتی‌توکسین استاندارد/رقت آنتی‌سرم خرگوش × واحد آنتی توکسین استاندارد = واحد آنتی توکسین خرگوش IU

تهیه Checkerboard

Checker board با استفاده از غلظت‌های متفاوتی از آنتی‌ژن بتا و نیز غلظت‌های مختلف آنتی‌سرم مثبت، منفی و شاهد جهت تعیین میزان مناسب آنتی‌ژن و آنتی‌سرم (آنتی بادی) انجام پذیرفت. همچنین بهینه‌سازی شرایط الایزا با نوع کوتینگ (بافر کربنات یا PBS)، دما و زمان انکوباسیون کوتینگ (یک ساعت در ۳۷ و یا یک شب در ۴ درجه)، نوع ماده بلاک کننده (بافر BSA ۱٪ با کازئین هیدرولیزیت ۲٪)، غلظت کونژوگه (۱/۴۰۰۰، ۱/۶۰۰۰، ۱/۸۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰) ، دما و زمان انکوباسیون (۳۷ درجه و یا دمای آزمایشگاه)، (۳۰،۴۵ و ۶۰ دقیقه) و مناسبترین رقیق کننده کونژوگه و سرم کازئین و (BSA ۱٪) طراحی و تعیین گردید.

تکرارپذیری واکنش‌های آنتی‌بادی و آنتی‌ژن

برای این منظور سه غلظت مختلف آنتی‌سرم (حد متوسط و حد بالا) و کنترل منفی بصورت سه تکرار در هر نمونه و همچنین در سه نوبت کاری انجام گردید. سپس با محاسبه SD (Standard Deviation) و Mean (میانگین) و CV (ضریب تغییر) و با بررسی اطلاعات توسط Excel نتایج Intra assay و Inter assay حاصل گردید.

Mean = Σxí/n

$$SD = \frac{\sqrt{\sum(OD_{sample} - OD_{mean})2}}{N}$$

CV (Coefficient of Variation) = SD/ Mean

اختصاصیت آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن

این آزمون واکنش متقاطع توکسین غیراختصاصی با آنتی‌سرم را مشخص نمود. برای این منظور از توکسین اپسیلون کلستریدیوم پرفرینجنز (CN۴۰۹)، توکسین آلفا کلستریدیوم سپتیکوم (CN۹۱۳) و نووئی (CN۹۰۱) و باکتری کلستریدیوم شووای (جدایه ایرانی موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) استفاده گردید. پس از انتخاب مناسب‌ترین غلظت‌های کاری (آنتی‌ژن و آنتی‌سرم کنترل مثبت، منفی و آنتی‌سرم تست) آزمون الیزا بر روی نمونه‌ها انجام گردید.

آزمون الایزا

محلول توکسین بتا با غلظت ۱/۱۵۲ توسط بافر کربنات آماده‌سازی گردید. سپس۵۰ میکرولیتر در چاهک‌های میکروپلیت (Bioneer) ریخته و به مدت یک شب در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس چهار مرتبه به مدت دو دقیقه توسط محلول PBS ۱٪ (Phosphate-buffered saline) و محلول توئین ۲۰ شستشو داده شد و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول BSA ۱٪ (سیگما) (۰/۰۱g/mlμ) بلاک گردید. در مرحله بعد آنتی‌سرم‌های تست و کنترل منفی با محلول دایلونت (حاوی PBS ۱٪ ، توئین ۲۰ و BSA ۱٪) به نسبت ۱/۱۰ و کنترل مثبت به نسبت ۱/۴۰۰ رقیق گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه داخل ردیف‌ها ریخته شد. پلیت به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از اتمام زمان مورد نظر، شستشو مانند مرحله ۲ انجام پذیرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر کونژوگه (سیگما) (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody-HRP) با غلظت ۱/۶۰۰۰ در هر چاهک اضافه و بمدت ۶۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان مورد نظر، پنج بار پلیت را شسته و ۵۰ میکرولیتر TMB (Roche) داخل چاهک‌ها ریخته و به مدت زمان 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. تیتر الایزا مطابق فرمول زیر محاسبه گردید.
غلظت سرم × (آنتی‌ژن + کونژوگه) OD زمینه - OD نمونه=محاسبه

تیتر الایزا
سپس جهت افتراق نمونه‌های کنترل مثبت از منفی محاسبه Cut off از نمونه‌های کنترل منفی انجام گردیده و به این صورت مرز بین نمونه‌های واکسینه و غیرواکسینه تعیین گردید.

Cut off = Mean (Neg control) + 2SD

نتایج حاصل شده از روش SN با الایزا با استفاده از روش ضریب همبستگی (R) و معنی‌دار بودن (P value) توسط نرم‌افزار SPSS مقایسه گردید.

نتایج

حداقل دوز کشندگی توکسین و حداقل دوز کشندگی در هر میلی‌گرم به تفصیل در جدول ۱ آورده شده است.

تائید خنثی گشتن توکسین آلفا در خوکچه های هندی

هیچ‌گونه تغییر رنگ و لکه‌های بنفش رنگ در محل تزریق مشاهده نگردید که نمایانگر خنثی شدن توکسین آلفا در نمونه می‌باشد.
مقدار پروتئین موجود در توکسین با آزمون لوری پس از تخلیص تا مرحله دیالیز ۵۶ میلی‌گرم و در مرحله ستون ۱۰ میلی‌گرم شد.

نتایج تعیین غلظت آنتی‌ژن و سرم‌های کنترل مثبت و منفی

بهترین غلظت‌های آنتی‌ژن و سرم (آنتی‌بادی) به ترتیب ۱/۵۱۲ و برای آنتی‌سرم هایپرایمیون (کنترل مثبت) ۱/۴۰۰ و برای سرم‌های کنترل منفی و نمونه‌های تست ۱/۱۰ تعیین گردید.
میزان انحراف معیار و ضریب تغییر پایین نمایانگر راه‌اندازی مناسب سیستم الایزا بود که به دفعات مختلف تکرار گردید که در جدول ۲ آورده شده است.

بررسی اختصاصیت آنتی‌سرم برای توکسین بتا

توکسین بتا جذب نوری بیش از حد آستانه یا cut off داشته است و سایر تیپ‌های کلستریدیوم پرفرنژنس و کلستریدیوم نویی و شووای از این حد آستانه، تجاوز ننموده است و این نتایج نشان‌دهنده عدم وجود کراس توکسین بتا با سایر توکسین‌های کلستریدیوم پرفرینجنز، نوئی، سپتیکوم

جدول ۱- نتایج حداقل دز کشندگی (جهت سنجش تغییرات میزان کشندگی توکسین) قبل و در مراحل مختلف تخلیص

مرحله	مرحله به تفکیک	حداقل دز کشندگی	حداقل دز کشندگی در هر میلی گرم
قبل از ترسیب	قبل از ترسیب	۲×۱۰^{۳}	-
پس از ترسیب و تخلیص	ترسیب با سولفات آمونیوم	۶×۱۰^{۳}	۱۰۷/۱
	کروماتوگرافی مرحله اول	۴×۱۰^{۳}	۴۰۰
	کروماتوگرافی مرحله دوم	۱×۱۰^{۳}	۸۳۳۳/۳

جدول ۲- نتایج تکرار پذیری واکنش های سرم و آنتی ژن

سرم	میانگین	انحراف معیار	میانگین + انحراف معیار	ضریب تغییر
کنترل مثبت (هایپرایمیون)	۲/۰۵۶	۰/۰۸۳	۲/۰۵۶±۰/۰۸۳	۴/۰۳۶
سرم حد متوسط (سرم جمع آوری شده از یک واکسیناسیون بدون ادجوانت و یاد آور آن)	۰/۴۵۵	۰/۰۳۳	۰/۴۵۵±۰/۰۳۳	۷/۲۵
کنترل منفی	۰/۳۶۹	۰/۰۳۳	۰/۳۶۹±۰/۰۳۳	۸/۹

Cut off = Mean (Neg control) + 2SD = ۰/۳۶۹ + ۲ * ۰/۰۳۳ = ۰/۴۳۵

و باکتری کلستریدیوم شووای می‌باشد. نتیجه آزمون در نمودار ۱ آورده شده است.

همانطور که اشاره گردید تیتر الایزا بر حسب واحد در هر میلی‌لیتر مطابق فرمول زیر محاسبه گردید.

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

نتایج آزمون الایزا و سرم نوترالیزاسیون در سرم خرگوش‌های واکسینه در جدول ۳ نشان داده شده است.

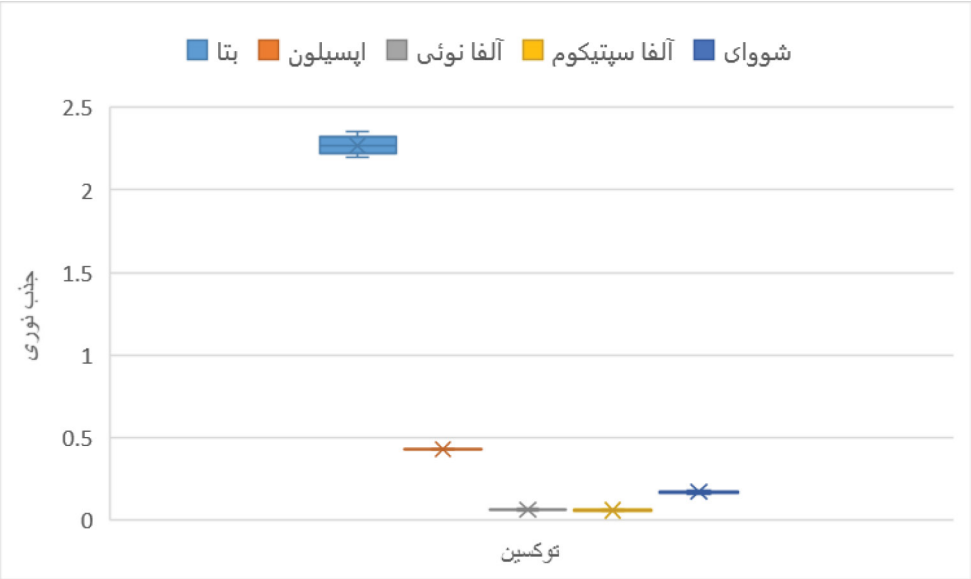
همان‌طور که نتایج مقایسه آزمون الایزا و سرم نوترالیزاسیون نشان داد در هیچ موردی تست سرم نوترالیزاسیون منفی کاذب نداشته و در ۳ مورد مثبت کاذب مشاهده گردید که نشانگر حساسیت، ارزش پیشگویی مثبت و منفی بالا می‌باشد. نتایج آزمون الایزا و سرم نوترالیزاسیون در سرم خرگوش‌های واکسینه در جدول ۴ خلاصه شده است. در این پروژه حساسیت، ارزش پیشگویی مثبت و منفی و دقت الایزا در نمونه سرم خرگوش‌های واکسینه به ترتیب ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۸۵٪ و ۸۴/۲۱٪ محاسبه گردید. ولی ویژگی الایزا به دلیل کم بودن موارد منفی واقعی نسبت به مثبت کاذب، مناسب نبود. دامنه تغییرجذب نوری سرم‌های مثبت و منفی(cut-off) محاسبه گردید. نمونه‌هائی با مقادیر جذب نوری بالاتر از ۰/۴۷۷ مثبت (آلوده)، نمونه‌هائی با مقادیر جذب نوری کمتر از ۴۳۵ /۰ منفی (سالم)، و نمونه‌هائی که مقادیر جذب نوری آنها بین ۰/۴۳۵ و ۰/۴۷۷ باشد به عنوان نمونه‌های مشکوک تلقی شدند.

ارتباط و ضریب رگرسیون بین سرم نوترالیزاسیون و الایزا در نمونه سرم‌های مختلف در جدول و نمودار زیر آمده است.

همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد بین آزمون الایزا و سرم نوترالیزاسیون ضریب همبستگی خیلی خوبی وجود دارد (P< ۰/۰۱) < (R = ./۸۴)

بحث

کلستریدیوم پرفرینجنز عامل بیماری انتروتوکسمی یا پرخوری می‌باشد که بیماری حاد عفونی و عامل همه‌گیری می‌باشد. تعیین سطح آنتی‌بادی در حیوان هدف، به منظور برنامه‌ریزی اصولی در پیشگیری از بیماری و تنظیم برنامه واکسیناسیون ضروری می‌باشد. روش موجود درون تنی (In Vivo) برای بررسی میزان آنتی‌بادی، سرم نوترالیزاسیون می‌باشد که در بریتیش فارماکوپه و بعضی از مقالات به آن اشاره شده است (۳, ۱۴). لیکن این روش دارای معایبی می‌باشد. از جمله این روش زمان بر بوده و انجام آن برای تعداد زیاد نمونه امکان‌پذیر نمی‌باشد و نیز اندازه‌گیری مقادیر کم‌تر از ۱ واحد بین‌المللی توسط این روش امکان‌پذیر نمی‌باشد. هم‌چنین در این روش نیاز به حیوانات آزمایشگاهی بوده که مدافعین حقوق حیوانات استفاده زیاد از آن را اخلاقی نمی‌دانند (۴). از طرفی در سرم نوترالیزاسیون نیاز به آنتی‌توکسین استاندارد می‌باشد. با توجه به شرایط خریداری، بهتر است روش دیگری این نیاز را مرتفع سازد. یکی از روش‌های جایگزین در شیشه (in vitro) معتبر آزمون الایزا می‌باشد که دارای ویژگی بالا بوده و در زمان کوتاه انجام بررسی تعداد زیاد نمونه امکان‌پذیر می‌باشد (۱۰). البته این تکنیک دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد از جمله نیاز به پرسنل آموزش دیده، پیش تیمار جهت تهیه آنتی‌ژن سطحی مناسب و لیبلینگ آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی. علیرغم این



نمودار ۱- بررسی اختصاصیت آنتی سرم برای توکسین بتا

مسئله به دلیل داشتن مزایای عدیده در بررسی‌های مختلف از این آزمون برای تشخیص توکسین‌های کلستریدیایی استفاده و با دیگر آزمون‌ها مقایسه شده است (۲۵) که در زیر به بعضی مقالات در این زمینه اشاره شده است.

در بررسی تامسون (۱۹۸۲) و وود (۱۹۹۱) بر روی الایزای سرم گوسفند و مقایسه آن با سرم نوترالیزاسیون، همبستگی مناسبی بین دو تست نشان داده شد (۲۱). نیلور و همکارانش (۱۹۸۷) و همچنین مارتین و همکارانش در سال ۱۹۸۸ بر روی تشخیص انتروتوکسمی با آزمون الایزا براوردی انجام دادند. حساسیت و ویژگی این آزمون در مقابل آزمون حفاظت موش ۱۰۰-۹۰٪ محاسبه گردید (۱۲, ۱۶).

بری و همکارانش در سال ۱۹۸۸ برای تشخیص انتروتوکسمی بر روی ۱۹۲ نمونه مدفوع تحقیقی به روش‌های الایزا، لاتکس آگلوتیناسیون غیرفعال برعکس و اسی سلول ورو انجام دادند. نتایج تحقیق نشان داد اگرچه الایزا نسبت به روش‌های ذکر شده وقت‌گیرتر می‌باشد ولی ویژگی و تکرارپذیری آن نسبت به دو روش ذکر شده بیشتر می‌باشد. لاتکس آگلوتیناسیون غیرفعال برعکس، کمی حساسیت بیشتر از الایزا داشته ولی واکنش‌های غیراختصاصی داشت (۲). ال ایدریسی و وارد در سال ۱۹۹۲ و همچنین مولر و همکاران در سال ۱۹۹۵ بر روی تشخیص انتروتوکسمی

جدول ۳- مقایسه نتایج آزمون الایزا و سرم نوترالیزاسیون در سرم خرگوش‌های واکسینه

شماره	الایزا	SN
۱	۱۰,۵۳	۰
۲	۲۷,۸۲	۳۰
۳	۱۵,۶۷	۱۶
۴	۱۲,۰۶	۲۰
۵	۸,۵	۰
۶	۴۱,۷۶	۴۰
۷	۳۸,۵۲	۴۰
۸	۲۱,۰۹	۰
۹	۲۹,۱	۲۶,۶۶
۱۰	۵۸,۷۸	۵۳,۳
۱۱	۲۸,۱۷	۳۲
۱۲	۲۹,۴	۰
۱۳	۲۶,۷۷	۱۶
۱۴	۴۸,۰۶	۵۳,۳
۱۵	۲۳,۰۹	۱۷,۷۷
۱۶	۲۳,۵	۲۲,۸۶
۱۷	۴۷,۸	۴۰
۱۸	۲۲,۹۶	۲۱,۳۳
۱۹	۲۲,۹۶	۲۰
۲۰	۲۰,۱۴	۲۰

با آزمون الایزا برآوردی انجام دادند. نتایج نشان داد حساسیت و ویژگی این آزمون در مقابل تست حفاظت موش و کشت به ترتیب ۹۰/۵٪ و ۸۹/۲٪ محاسبه گردید (۶, ۱۳).

در تحقیق اوزل در سال ۱۹۹۷ ضریب همبستگی بین دو روش الایزای غیرمستقیم و رقابتی والایزای غیرمستقیم و سرم نوترالیزاسیون بالا بود. همچنین هر دو الایزای غیرمستقیم و رقابتی دارای سرعت، سادگی، حساسیت و ویژگی بالایی برای تشخیص آنتی‌بادی بر علیه توکسین بتا گزارش شدند (۲۲).

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) مشخص شد روش‌های در شیشه (in vitro) ویژگی بالا و تکرار پذیری خوبی دارند. علاوه بر این ارتباط خوبی بین آزمون های در شیشه (in vitro) و درون تنی (In Vivo) وجود دارد (۵).

کیت در سال ۱۹۹۹ از پنج آزمون مختلف الایزا برای تشخیص آنتی توکسین بتا کلستریدیوم پرفرینجنز استفاده نمود. در نهایت بلاکینگ الایزا را به عنوان مناسب‌ترین روش جایگزین تست بیولوژیک پیشنهاد نمود (۹).

در مطالعه‌ای دیگر توسط روسکوپوف (۲۰۰۴) نشان داده شد آزمون الایزای غیرمستقیم می‌تواند به عنوان روشی قابل اجراء برای بررسی آنتی توکسین‌های کلستریدیایی بکار گرفته شود (۱۷). همچنین در بررسی باب از آزمون الیزا برای تایپینگ جدایه‌های توکسیژنیک کلستریدیوم پرفرینجنز در شترمرغ استفاده گردید (۱). در سال ۲۰۱۷ نیز تحقیقی توسط Feraudet-Tarisse بر روی کلستریدیوم پرفرینجنز توسط تکنیک‌های ایمونواسی و ایمونوکروماتوگرافی انجام شد. نتایج بررسی نشان داد آزمون‌های ایمونواسی طراحی شده با حساسیت بالا، برای تحقیقات اپیدمیولوژی مفید می‌باشند (۷).

نتایج این مطالعه با بررسی‌های قبلی در این زمینه مطابقت دارد. همچنین ارتباط معنی‌داری بین آزمون الایزا و SN در گروه خرگوش‌های واکسینه وجود دارد. یعنی بجای تست SN در این موارد می‌توان از آزمون الایزا

جدول ۴- نتایج آزمون الایزا و سرم نوترالیزاسیون در سرم خرگوش های واکسینه

		سرم نوترالیزاسیون	
		سرم نوترالیزاسیون مثبت	سرم نوترالیزاسیون منفی
الایزا	الایزا مثبت	۱۶	۳
		مثبت واقعی	مثبت کاذب
	الایزا منفی	۰	۱
		منفی کاذب	منفی واقعی

جدول ۵- ارتباط بین سرم نوترالیزاسیون و الایزا در نمونه‌های سرم خرگوش‌های واکسینه با واکسن تتراوالان انتروتوکسمی

		SN نمونه واکسن انتروتوکسمی	ELISA نمونه واکسن انتروتوکسمی
SN نمونه واکسن انتروتوکسمی	همبستگی پیرسون	۱	۰/۸۴۴
	معنی دار بودن دو جهته		۰/۰۰۰
	تعداد موارد	۲۰	۲۰
ELISA نمونه واکسن انتروتوکسمی	همبستگی پیرسون	۰/۸۴۴	۱
	معنی دار بودن دو جهته	۰/۰۰۰	
	تعداد موارد	۲۰	۲۰

استفاده نمود که البته این مسئله در حیوانات هدف نیاز به تحقیقات بیشتر دارد. لذا نوآوری این تحقیق استفاده از الایزا برای تحقیقات اپیدمیولوژی عفونت‌های کلستریدیایی در انسان و انتروتوکسمی و بیماری‌های دیگر در دام و به عنوان جایگزین مناسب SN می‌باشد به خصوص زمانی که میزان آنتی‌توکسین کمتر از ۱ واحد بین‌المللی باشد. همانطور که در این تحقیق میزان آنتی‌توکسین در روش SN برای نمونه شماره ۵، صفر و در الایزا ۸/۵ واحد برآورد گردید. ال ایدریسی و وارد و همچنین ناگاهاما و همکاران گزارش کردند الایزا مقادیر ۸-۱ نانوگرم در هر میلی‌لیتر از توکسین بتا در محیط کشت و ۳۰ نانوگرم توکسین در هر گرم از محتویات روده را اندازه‌گیری می‌نماید (۱۵).

نتیجه‌گیری

الایزا به عنوان آزمونی مناسب در حیوانات آزمایشگاهی برای مطالعات اپیدمیولوژی پیشنهاد می‌شود که ایمنی واکسن را ارزیابی می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از پرسنل بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی بی هوازی که در مراحل مختلف پروژه همکاری نموده‌اند تشکر می‌کنند.

منابع مورد استفاده

1- 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.

2 - Berry, P., J. C. Rodhouse, S. Hughes, B. Bartholomew and R. Gilbert. 1988. Evaluation of ELISA, RPLA, and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens. *Journal of clinical pathology* 41: 458-461.

3 - British Pharmacopoeia. 2017. *Clostridium perfringens*. *Vet*: 229-231.

4- Daube, G., P. Simon, B. Limbourg, C. Manteca, J. Mainil and A. Kaeckenbeeck. 1996. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (alpha, beta, epsilon, iota, theta, mu, and enterotoxin) and for sialidase. *American journal of veterinary research* 57: 496-501.

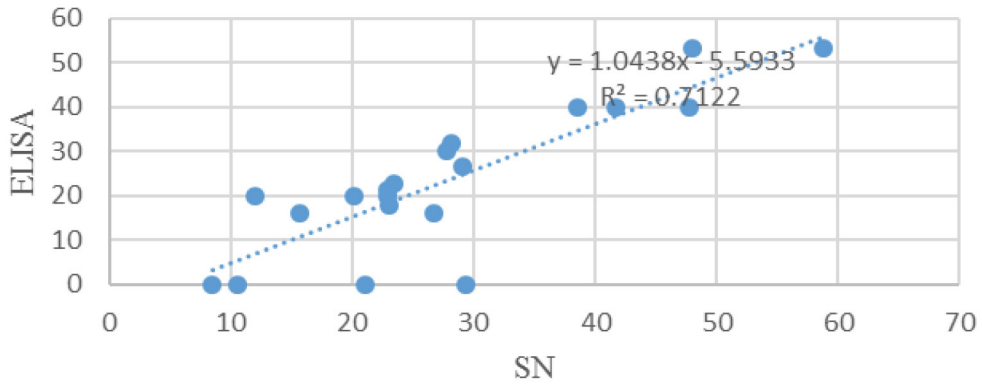
5- Ebert, E., V. Öppling, E. Werner and K. Cussler. 1999. Development and prevalidation of two different ELISA systems for the potency testing of *Clostridium perfringens* β-and ε-toxoid containing veterinary vaccines. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 24: 299-311.

6- 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.

7- 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.

8- Gurjar, A., J. Li and B. A. McClane. 2010. Characterization of toxin plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates. *Infection and immunity* 78: 4860-4869.

9- Krt, B. 1999. Development and evaluation of various enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Clostridium per-*



نمودار ۲- ارتباط بین الایزا و سرم نوترالیزاسیون در سرم خرگوش‌های واکسینه با واکسن تتراوالان انتروتوکسمی

(محور X مقدار SN بر حسب IU (International Unit) و محور Y میزان جذب بر اساس واحد در هر میلی‌لیتر)

fringens β anti-toxins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 24: 293-297.

10 - Law, J. W.-F., N.-S. Ab Mutalib, K.-G. Chan and L.-H. Lee. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology* 5: 770.

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 - Martin, P., R. Naylor and R. Sharpe. 1988. Detection of *Clostridium perfringens* β toxin by enzyme-linked immunosorbent assay. *Research in veterinary science* 44: 270-271.

13- Møller, K. and P. Ahrens. 1996. Comparison of Toxicity Neutralization-, ELISA-and PCR Tests for Typing of *Clostridium perfringens* and Detection of the Enterotoxin Gene by PCR. *Anaerobe* 2: 103-110.

14- Moreira, G. M. S. G., F. M. Salvarani, C. E. P. Da Cunha, M. Mendonça, Â. N. Moreira, L. A. Gonçalves, P. S. Pires, F. C. F. Lobato and F. R. Conceição. 2016. Immunogenicity of a trivalent recombinant vaccine against *Clostridium perfringens* alpha, beta, and epsilon toxins in farm ruminants. *Scientific reports* 6: 22816.

15 - Nagahama, M., K. Kobayashi, S. Ochi and J. Sakurai. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens*. *FEMS microbiology letters* 84: 41-44.

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

17- 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.

18- Sakurai, J. and M. Nagahama. 2006. *Clostridium perfringens* beta-toxin: characterization and action. *Toxin Reviews* 25: 89-108.

19- Sayeed, S., J. Li and B. A. McClane. 2010. Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates. *Infection and immunity* 78: 495-504.

20 - Smith, D. 1986. The pathogenic Anaerobic Bacteria. *Clostridium Perfringens.* Chapter 7. Charles Thomas publisher. Spring field. USA.

21- 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.

22- 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.

23- Vidal, J. E., B. A. McClane, J. Saputo, J. Parker and F. A. Uzal. 2008. Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. *Infection and immunity* 76: 4396-4404.

24- Zayerzadeh, E., A. Fardipour and A. Jabbari. 2015. A New Purification Method for Beta-Toxin of *Clostridium perfringens* Type C Vaccinal Strain. *Journal of Medical Bacteriology* 3: 8-13.

25- Zhao, X., C.-W. Lin, J. Wang and D. H. Oh. 2014. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 297-312.