# بررسی پاسخ آنتی بادی های منو کلونال بر علیه آنتروتوکسین اپسیلون کلوستریدوم پرفرینجنس

**رویا صدری**

**کرج، سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش تشخیص و تحقیق بیماری های ویروسی دام**

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲۳

## چکیده

کلوستریدیا پرفرینجنس باکتری بی‌هوازی است که با ترشح توکسین اپسیلون منجر به بیماری کشنده آنتروتوکسیمی در دام می‌شود. در این مطالعه اثر سیتوتوکسیسیته دو منوکلونال آنتی‌بادی خنثی‌کننده شامل4D7 و5B7 برعلیه توکسین اپسیلون بررسی شد. بدین منظور باکتری کلوستریدیا پرفرینجنس بر روی سلول تهیه‌شده از کلیه سگ نژاد مدین دربی (Madin Derby Canine Kidney) کشت داده شد و سلول‌ها بوسیله ۷ استینو دی‌آمین (Acetinodiamine) رنگ‌آمیزی شدند و دو منوکلونال (Monoclonal) به آن افزوده و در انکوباتور قرارداده شدند. دو آنتی‌بادی منوکلونال4D7 و 5B7 از تشکیل منافذ در غشای سلولی کلیه سگ نژاد مدین دربی MDCK (Madine Derby canine kidney) ممانعت نمودند. به کمک آنالیز توکسین‌های موتانت و دو آزمون الایزای رقابتی و آرایه پپتیدی، به کمک آنتی‌بادی منوکلونال 4D7 آمینو اسیدهای ۱۴۵،۱۳۴ تشخیص داده شد. همچنین مشخص گردید آنتی‌بادی‌های منوکلونال خنثی‌کننده، سبب تشخیص اپی‌توپ (epitope) دیگری نیز در نزدیکی این ناحیه می‌شوند. این ناحیه از آمینواسیدهای ۱۴۵، ۱۳۴ تشکیل‌شده است که حلقه مولکول پروتئین آمفی پاتیک الحاقی (Fusion amphomatic) با غشای توکسین هم‌پوشانی دارند. تعیین هویت و مشخص کردن اپی‌توپ‌های شناخته‌شده توسط آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده نخستین گام مهم در روند توسعه درمان عوامل بیماری‌زا و نیز قابل‌استفاده در مواجهه با اثر توکسین اپسیلون کلوستریدیاها (Epsilon clostridia) در آینده نزدیک می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی**: کلوستریدیوم پرفرینجنس، توکسین اپسیلون، آنتی‌بادی منوکلونال

نویسنده مسئول، تلفن: ۲۶۳۴۴۵۷۰۰۳۸، پست الکترونیکی :Royasadri@rvsri.ac.ir

## مقدمه

گونه کلستریدیوم پرفرینجنس عامل مهم بیماری‌زای روده‌ای انسان و حیوانات است این باکتری با ترشح توکسین‌های زیاد نقش مهمی در بیماری‌زائی داشته و براساس وجود اختلاف در توکسین‌های ترشحی آن (توکسین آلفا، بتا، اپسیلون و یوتا) جنس کلوستریدیاها به پنج تیپ تقسیم می‌شوند. تیپ B و D با ترشح توکسین اپسیلون منجر به بیماری کشنده (آنتروتوکسمی) در انواع مختلف دام‌های اهلی بویژه گوسفندان می‌شوند (۲۵). هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت و مشخص کردن اپی‌توپ‌های شناخته‌شده توسط آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده است که نخستین گام مهم درروند توسعه درمان عوامل بیماری‌زا و نیز قابل‌استفاده در مواجهه با اثر توکسین اپسیلون کلوستریدیا می‌باشد. در این تحقیق اثر دو آنتی‌بادی منوکلونال با مهار فعالیت سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون کلوستریدیاها از تشکیل منافذ در غشای سلولی بررسی و تعیین شد. علائم بالینی بیماری در گوسفندان مسموم شامل دل‌درد، اسهال و نشانی‌های متعدد عصبی است. درکالبد گشایی، افزایش قابلیت نفوذپذیری

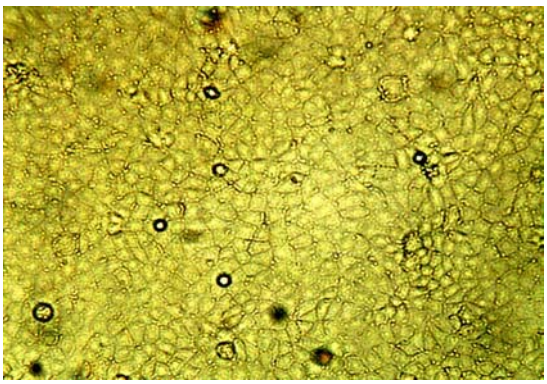
عروق خونی مغز، قلب، ریه‌ها و تورم کلیوی مشهود بود (۳۱،۲۶). مسمومیت با توکسین اپسیلون در مدل‌های آزمایشگاهی(رت و موش) سبب مرگ و تغییرات پاتولوژیکی مشابه آنچه که در دام‌های اهلی مشاهده می‌شود می‌گردد (۲، ۴، ۵، ۱۷، ۲۰). دز لازم کشنده توکسین اپسیلون جهت کشتن ۵۰٪ موش‌ها بین ۱۱۰ – ۶۵ نانو گرم بر کیلوگرم است (۱۳) و مؤید آن است که توکسین اپسیلون یکی از قوی‌ترین توکسین‌های پروتئینی باکتریائی می‌باشد (۶). برخلاف گزارشات موجود، تاکنون مشخص نگردیده که آیا توکسین اپسیلون سبب بیماری در انسان هم می‌شود یا خیر (۷، ۱۲، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۷). با توجه به تهدید توکسین اپسیلون باکتری در سلامت دام، حفاظت گله در برابر آن بوسیله واکسن (توکسوئید اپسیلون) و یا آنتی‌توکسین گرفته‌شده از اسب می‌باشد که براساس سرعت پیشرفت بیماری صورت می‌گیرد. درمان بیماری اساساً بر پیشگیری بوسیله واکسیناسیون گروهی و یا تزریق آنتی‌توکسین به دام‌های غیرواکسینه در زمان شیوع بیماری آنتروتوکسیمی در بین دام‌های گله صورت می‌گیرد (۱). لذا اقدامات جایگزین جهت ممانعت از فعالیت توکسین ضروری می‌باشد. دراین مطالعه از فعالیت توکسین اپسیلون به‌وسیله دو آنتی‌بادی منوکلونال به روش کشت سلولی ممانعت بعمل آمد و آنتی بادی‌های منوکلونال فعالیت سیتوتوکسیک توکسین اپسیلون را در مدل‌های آزمایشگاهی خنثی نمودند. جهت بررسی فعالیت توکسین اپسیلون از سلول تک لایه قابل تکثیر شده کلیه سگ نژاد مدین دربی (Madin Derby Canine Kidney) به روش *In vitro* استفاده شد. با استفاده از آزمون الایزای رقابتی و آرایه پپتیدی، موتانت‌های نوترکیب توکسین اپسیلون، نقشه اپی توپ‌ها با تعیین نمودن اپی‌توپ‌ها بوسیله دو آنتی‌بادی که در غشای دومن (Domine) توکسین اپسیلون وارد شده بودند و با آن‌ها همپوشانی داشتند، مشخص شد.

## مواد و روشها

کلوستریدیوم پرفرینجنس تیپ B سویه , ATCC 3626 (NCTC 13110, NCIMB 10691) با استفاده از سیستم گازی فشرده (GAS PAK Becton Dickinson) در محیط کشت رشد TGY (Thioglycolate yeast)(که شامل ۳۰ گرم تریپتون،۲۰ مخمر گرم، ۵ گرم دکستروز و ۰/۵ گرم سیستئن در لیتر) در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد بصورت بی‌هوازی کشت و به مدت یک شبانه‌روز نگهداری گردید. پروتوکسین اپسیلون توسط واکنش هیدروفوبیک تخلیص و بکمک کروماتوگرافی تبادل یونی انجام شد. پروتئین‌ها از مایع روئی کشت بوسیله سولفات آمونیوم ۷۰٪ از فیلتر استریل رسوب داده شدند و پروتئین‌های رسوبی در تریس بافر ۵ میلی مولار در ۷/۵ = محیط قلیایی(pH) حل شدند. غلظت سولفات آمونیوم به یک مول رسید و نمونه پروتئین بر روی ستون فنیل سفارز (Phenyle sepharose) برده شد و ستون بوسیله سولفات آمونیوم ۰/۸مول در تریس بافر ۵ میلی مول با ۷/۵= محیط قلیایی شتستشو داده شد. باندهای پروتئین طی یک مرحله شستشو با تریس بافر (Tris buffer) جدا شدند و باقیمانده سولفات آمونیوم نمونه هم به کمک فیلتر بالا در تریس بافر ۵ میلی مول با ۷/۵= محیط قلیایی خارج شد. نمونه بر روی ستون سفارز (sepharose) در تریس بافر موازنه شد و بخش پروتئین کد نشده که شامل پروتوکسین اپسیلون بود، با روش Micro assay جمع‌آوری و رقت های پروتئینی تعیین شدند. آنتی‌بادی‌های آنتی‌توکسین اپسیلون 4D7 و 5B7 ایمینوگلوبولین‌های ایزوتایپ G1 (G -Isotope) هستند و از ایمینوگلوبولین G1، آنتی‌بادی منوکلونال موش به‌عنوان آنتی‌بادی کنترل منفی استفاده شد.

آنتی‌بادی‌ها (آنتی‌بادی‌های کنترل منفی، آنتی‌توکسین اپسیلون 4D7 و آنتی‌توکسین اپسیلون 5B7) براساس واکنش با آنزیم آنتی کونژوگه HRP نرمال و دیگر آنتی‌بادی‌ها مورد استفاده، هم به شکل تجاری تهیه و مانند آنتی بتا لاکتین و آنزیم آنتی کونژوگه HRP خرگوش و آنتی HIS تهیه شد. واکنش با افزودن هیدروزیلامین

(Hydro sylamine) با غلظت نهائی ۱۵۰ میلی مول متوقف شد. آنتی‌بادی نشانه‌دار شده در ستون دوار نمک زدائی، مشخص شد. آنتی‌بادی5B7 از مایع استاز (Acetase) براساس دستورالعمل سازنده تخلیص و به آنزیم کونژوگه ( EZ ) متصل و با بیوتین نیتروسولفور ( NHS ) در گرمخانه نگهداری شد. آنتی‌بادی نشان‌دار شده با استفاده از ستون دوار نمک زدائی شرکت زبا ( Zeba ) مشخص گردید. سلول‌های کلیه سگ قابل تکثیر MDCK در محیط کشت رشد Leibovitz L15 که با ۱۰٪ سرم جنینی گوساله غنی‌شده بودند کشت داده شدند (شکل ۱).



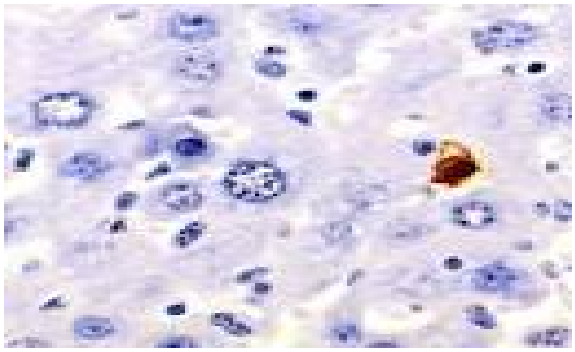
شکل ۱- سلول نرمال کلیه سگ منولایر شده نژاد مدین در بی (MDCK)

سیتوتوکسیسیته پروتوکسین اپسیلون تخلیص شده بکمک آنزیم فعال‌کننده تریپسین تعیین شد (۶). سپس تعداد $۱\times۱۰^{۴}$ تا $۲\times۱۰^{۴}$ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد (۹، ۱۴، ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴). نهایتاً توکسین اپسیلون به سلول‌ها افزوده شد و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۶ ساعت نگهداری و سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون با رنگ‌آمیزی سلول به کمک معرف متابولیکی تترا زولیوم بروماید (MTT) تعیین گردید (۱۳، ۳۰). میزان دز توکسین مورد نیاز جهت کشتن ۵۰٪ از سلول‌های منولایر شده ($CT_{50}$) به کمک فرمول ریگراسیون آنالیز گردید. ردیابی منافذ و خلل و فرج تشکیل شده بوسیله توکسین اپسیلون براساس میزان دریافت اسید نوکلئیک سلولی، رنگ‌آمیزی شد. توکسین اپسیلون مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محیط به تنهائی یا محیط غنی‌شده با مکمل و آنتی بادی‌های خنثی‌کننده کنترل نگهداری شدند و سپس این مخلوط به سلول‌های MDCK به تعداد $۵\times۱۰^{۴}$ یا $۲\times۱۰^{۴}$ به هر چاهک پلیت افزوده شد و مدت‌زمان ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند. سلول‌های رنگ‌آمیزی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه در گرمخانه نگهداری شدند. سپس محیط روی سلول‌ها خارج و سلول‌ها به‌آرامی با بافر نمکی فسفات شستشو داده شدند و بوسیله فرمالدئید ۴٪ در بافر فسفات نمکی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت نیم ساعت تثبیت شدند و سپس برای سه مرتبه در استات آمونیوم شستشو داده شده و به کمک میکروسکوپ فلورسنس، اسلایدها رؤیت شد. آزمون الایزای رقابتی با افزودن توکسین اپسیلون تخلیص شده در میکروپلیت که کف چاهک‌های آن از منوکلونال آنتی‌بادی 4D7 یا 5B7 آنتی‌توکسین اپسیلون پوشیده شده بود نیز اجرا شد (۳). پلیت مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس چاهک‌های پلیت جهت حذف توکسین‌های متصل نشده سه مرتبه شستشو داده شدند و با آنتی‌بادی‌های کنترل منفی، آنتی‌بادی آنتی‌توکسین اپسیلون 5B7، یا آنتی‌بادی آنتی‌توکسین اپسیلون 4D7 بمدت یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت حذف آنتی‌بادی متصل نشده. چاهک‌های ظرف پلیت، برای سه مرتبه شستشو داده شدند و سپس مدت یک ساعت با آنتی‌بادی نشانه‌دار شده با بیوتین 5B7 در گرمخانه قرارگرفتند. چاهک‌های ظرف پلیت سه مرتبه جهت حذف آنتی‌بادی بیوتینه شده غیرمتصل شستشو داده شدند و آنتی‌بادی متصل با استفاده از آنزیم کونژوگه و سوبسترا ردیابی شد.

## نتایج

دراین مطالعه هویت پروتوتوکسین اپسیلون تخلیص شده با آنتی‌بادی منوکلونال ویژه توکسین اپسیلون در آزمون

ایمنوبلات تأیید شد و پس‌ازآنکه این پروتوکسین بوسیله آنزیم پروتئاز به توکسین فعال تبدیل شد، پروتئین‌های مشترک از نمونه کلوستریدیوم پرفرینجنس حذف گردیدند. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سلولی نشان داد که میزان دز توکسین اپسیلون لازم برای از بین بردن ۵۰٪ سلول‌ها ($CT_{50}$) ۱۹ نانو گرم بر میلی لیتر می‌باشد. فعالیت سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون بوسیله آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده موش (5B7،4D7) مهار گردید. همانگونه که انتظار می‌رفت دو آنتی‌بادی 4D7 و5B7 از سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون با یک دز معین ممانعت بعمل آوردند و در مقابل آنتی‌بادی کنترل منفی در هر دز آزمایش شده قادر به مهار فعالیت سیتوتوکسیسیته نشد. مرگ سلولی بوسیله توکسین اپسیلون مربوط به تشکیل منافذ بزرگ و وسیع در غشای پلاسمائی سلول هدف بوسیله توکسین است. در بررسی قابلیت آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده برای ممانعت از تشکیل منافذ بوسیله توکسین اپسیلون، هسته سلول‌های MDCK در رنگ‌آمیزی مقاوم بود. غشاء پلاسمائی سلول قابلیت نفوذ در برابر رنگ را دارا بوده و در مقابل، هسته سلول‌های متأثر از توکسین اپسیلون، به سهولت رنگ‌پذیر شدند و با تشکیل منافذ بوسیله توکسین، سازگار شدند. اثر ممانعت کنندگی آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده برای تشکیل منافذ بر توکسین اپسیلون، با میکروسکوپ فلورسنت نشان داده شد که در آن هر دو آنتی‌بادی بجز آنتی‌بادی کنترل، از رنگ‌پذیری سلول ممانعت بعمل آوردند و نیز نشان داده شد که آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده از قابلیت تشکیل منافذ بوسیله توکسین اپسیلون جلوگیری می‌کنند (شکل ۲).



شکل۲– سلول های اپی تلیال کلیه سگ متأثر شده از منوکلونال آنتی بادی 4D7 و عاری از تشکیل منافذ در غشای سلول کلیه سگ نژاد مدین دربی (MDCK)

در تعیین اینکه آیا آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در واکنش با سلول MDCK سبب مهار فعالیت توکسین اپسیلون می‌شود یا خیر، مشخص شد که از فعالیت سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون نشانه‌گذاری شده کاسته نشده است و هر دو آنتی‌بادی 4D7 و5B7 قادر به خنثی‌سازی فعالیت سیتوتوکسیک توکسین نشانه‌گذاری بوده‌اند. نتیجه آزمایش اثر آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده بر توکسین اپسیلون متصل شده به سلول‌های MDCK، در مقایسه با آنتی‌بادی کنترل منفی، هر دو آنتی‌بادی خنثی‌کننده سبب کاهش مقدار توکسین اپسیلون متصل شده به سلول‌ها شده بودند. میانگین کاهش توکسین اپسیلون متصل شده به سلول‌ها در حضور آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده جهت فقدان سیتوتوکسیسیته ممکن است کافی نباشد. برای تعیین اینکه آیا آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده بدنبال اتصال توکسین اپسیلون به سلول‌ها مانع رویدادی شده‌اند یا خیر، قابلیت آنتی‌بادی‌های 4D7 و 5B7 جهت مهار سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون متصل شده به سلول‌های MDCK در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مورد تأیید قرارگرفت. پس از حذف توکسین متصل نشده به سلول‌های منولایر MDCK و در محیط کشت محتوی آنتی‌بادی‌های کنترل منفی و

نوترالیزان، صرفاً آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده قادر به جلوگیری از فعالیت سیتوتوکسیک توکسین اپسیلون بودند که برای اولین مرتبه در غیاب آنتی‌بادی به سلول‌ها باند شده بودند. از این نتایج نتیجه گرفته می‌شود که هر دو آنتی‌بادی خنثی‌کننده از سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون باند شده به سلول ممانعت نموده‌اند و نیز از رویدادی که پس از باند شدن توکسین به سلول‌ها می‌شوند جلوگیری به عمل می‌آورند.

## بحث

توکسین اپسیلون به‌وسیله کلوستریدیوم پرفرینجنس تیپ B, D بشکل نسبتاً غیرفعال بنام پروتوکسین اپسیلون تولید می‌شود که در سیستم گوارشی دام (گوسفند و بز) پس از فعال شدن به شکل آنتروتوکسین اپسیلون کشنده قوی سبب مرگ‌ومیر صد درصدی می‌شود و در گاو هم این پروتوکسین سبب ایجاد زخم در ریه‌ها و سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۲۹، ۳۱). در مواردی هم اسب‌ها و گاوهای بالغ تحت تأثیر آن قرار می‌گیرند (۴، ۱۰، ۱۱). در نقشه‌برداری از اپی‌توپ‌ها هر پپتید (peptid) متشکل از دوازده آمینواسید بود و هریک از پپتیدها، ده آمینواسید پپتید قبلی را هم‌پوشانی می‌کنند. کیت تهیه‌شده جهت اجرای آزمون الایزای رقابتی براساس دستورالعمل سازنده با کاربرد آنتی‌بادی منوکلونال کنترل منفی یا آنتی‌بادی ویژه منوکلونال برعلیه توکسین اپسیلون راه‌اندازی و نتایج حاصل آن رؤیت و قرائت شد. بیش از یک‌صد سال قبل ایمنی غیرفعال بر علیه بیماری‌های توکسین‌دار نشان داده شد و براساس نتایج مطالعات گذشته هم‌جهت درمان بیماری آنتروتوکسیمی نیز از آنتی‌بادی آنتی‌توکسین دار برخی از توکسین‌های باکتری‌های قوی استفاده نموده‌اند (۱۲ و ۲۰). در موارد آنتروتوکسیمی تجویز آنتی سرم خنثی‌کننده اپسیلون به شکل پیشگیری کننده برای درمان دام‌های غیرواکسینه در زمان شیوع آنتروتوکسیمی هم استفاده می‌شد. از اپی‌توپ‌های مشخص‌شده توسط آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، فعالیت تعدادی از توکسین های عامل منتخب نیز کپی‌برداری شد (۸). علاوه بر آن نشان داده شد که این دو آنتی‌بادی اثرات خنثی‌کنندگی سیتو توکسیک توکسین اپسیلون را بر روی سلول MDCK دارند و نیز این دو آنتی‌بادی خنثی‌کننده از فعالیت تشکیل منافذ توسط توکسین اپسیلون ممانعت می‌کنند و سبب کاهش مقدار توکسین اپسیلون متصل شده به سلول‌ها در ۴ درجه می‌شوند (۲، ۲۸). این امکان وجود دارد که توکسین باند شده به یک گیرنده بوسیله واکنش با یک لیگاند گیرنده برگشت‌پذیر گردد. توکسین غیرقابل‌برگشت پذیر هم مربوط به سلولی است که بدنبال ورود توکسین به غشای پلاسمایی باشد. مطالعات گذشته بیانگر آنست که توکسین اپسیلون وارد غشای سلول شده و سبب تشکیل منافذ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشده است (۱، ۲۳). بطور قطع آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده اثر ممانعت کنندگی مستقیم بر روی ورود به غشای سلول توسط توکسین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهند و بنظر می‌رسد که آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده مانع واکنش بین توکسین اپسیلون و یک گیرنده است (۲۲) و یا به‌این‌علت که اپی‌توپ‌هایی که مستقیماً درگیر واکنش با گیرنده‌ها هستند مورد شناسایی واقع شده‌اند و یا بدین سبب که اتصال آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده با توکسین مانع شناسائی گیرنده به کمک یک گیرنده متصل به دومن شده است. کاهش غلظت توکسین از ۲/۵ واحد $CT_{50}$ (۴۷/۵ نانوگرم بر میلی گرم به ۱۹ نانوگرم بر میلی گرم) سبب کاهش میزان رنگ‌آمیزی MMT (tetrazolium based microculture assay (MTT)) به میزان ۵۰٪ معیار کنترل می‌گردد. لذا پیشنهاد می‌شود علاوه بر کاهش میزان توکسین باند شده به سلول، آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، چند مرحله اتصال را متوقف ساخته باشند و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده مانع سیتوتوکسیسیته توکسین اپسیلون که قبلاً به سلول‌ها متصل بودند شده است. آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده از واکنش بین گیرنده توکسین جلوگیری می‌کنند. آنتی‌بادی 4D7 سبب شناسایی پپتیدهای

مربوط به آمینواسیدهای ۱۴۵-۱۳۴ در آزمون آرایه پپتیدی شده است. قابلیت آنتی‌بادی بیوتین دار 5B7 جهت باند شدن به توکسین اپسیلون با نگهداری توکسین به همراه آنتی‌بادی فوق در گرمخانه با حذف آمینواسیدهای ۱۴۵-۱۳۴ قادر به شناسایی توکسین اپسیلون موتانت نیست لذا آنتی‌بادی 5B7 مهار می‌شود. همچنین محتمل است که آنتی‌بادی ممکن است سبب تشخیص اپی‌توپی‌هائی شود که با آمینواسیدهای ۱۴۵-۱۳۴ تداخل یافته‌اند.

## منابع


1-Adamson, R.H., Fernandez, Miyakawa, S., Ochi, J., Sakurai, F., Uzal, F., and Curry, E., 2005. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery, Infection and Immunity, 73, PP: 4879- 4887.

2- Aiello, S.E., 2003. Merck Veterinary Manual, 8th ed. Merck and Co. Inc, Whitehouse Station, N.J, 204-208.

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

4- Finnie, J.W., 1984. Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin, *Journal of Comparative Pathology*, 94, PP: 363-370.

5- Finnie, J.W., 1984. Ultrastructural changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin, *Journal of Comparative Pathology*, 94, PP: 445-452.

6-Gill, D.M., 1982. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiological Reviews, 46, PP: 86-94.

7- Gleeson-White, M.H, and Bullen, J.J., 1955. *Clostridium welchii* epsilon toxin in the intestinal contents of man, Lancet, 268, PP: 384-385.

8- Gubbins, M.J., Berry, J.D., Corbett, C.R., Mogridge, J., Yuan, X.Y., Schmidt, L., Nicolas, B., Kabani, A., and Tsang, R.S., 2006. Production and characterization of neutralizing monoclonal antibodies that recognize an epitope in domain 2 of Bacillus anthracis protective antigen, FEMS Immunology & Medical Microbiology, 47, PP: 436-443.

9- Gubbins, M.J., 2006. Production and characterization of neutralizing monoclonal antibodies that recognize an epitope in domain 2 of *Bacillus anthracis* protective antigen, FEMS Immunology & Medical Microbiology, 47, PP: 436-443.

10- Hauer, P.J., and Clough, N.E., 1999. Development of monoclonal antibodies suitable for use in antigen quantification potency tests for *clostridial* veterinary vaccines, Developments in Biological Standardization, 101, PP: 85-94.

11- Hauer, P.J., and. Clough, N.E., 1999. Development of monoclonal antibodies suitable for use in antigen quantification potency tests for clostridial veterinary vaccines, Developments in Biological Standardization, 101, PP: 85-94.

12- Kohn, J., and Warrack, G.H., 1955. Recovery of *Clostridium welchii* type D from man, Lancet, PP: 268:385.

13- Miller, C., Florman, S., Kim-Schluger, L., Lento, P., De La Garza, J., Xie, J., Wu, B., Zhang, W., Bottone, E., Zhang, D, and Schwartz, M., 2004. Fulminant and fatal gas gangrene of the stomach in a healthy live liver donor, Liver transplantation, 10, PP: 1315-1319.

14- Minami, J., Katayama, S., Matsushita, O., Matsushita, C., and Okabe, A., 1997. Lambda-toxin of *Clostridium perfringens* activates the precursor of epsilon-toxin by releasing its N- and C-terminal peptides. Microbiological Immunology, 41, PP: 527-535.

15- Miyamoto, O., Minami, J., Toyoshima, T., Nakamura, T., Masada, T., Nagao, S., Negi, T., Itano, T., and Okabe, A., 1998. Neurotoxicity of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin for the rat hippocampus via the glutamatergic system, Infectious Immunology, 66, PP: 2501-2508.

16- Miyata, S., Minami, J., Tamai, E., Matsushita, O., Shimamoto, S., and Okabe, A., 2002. *Clostridium perfringens* epsilon-toxin forms a heptameric pore within the detergent-insoluble microdomains of Madin-Darby canine kidney cells and rat synaptosomes, *Journal of Biological Chemistry*, 277, PP: 39463-39468.

17- Morinaga, G., Nakamura, T., Yoshizawa, J., and Nishida, S., 1965. Isolation of *Clostridium perfringens* type D from a case of gas gangrene, Journal of Bacteriology, 90, 826 p.

18-Nagahama, M., Kobayashi, K., Ochi, S., and Sakurai, J., 1991. Enzyme-linked immunosorbent

assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringen*s, FEMS Microbiology Letters, 68, PP: 41- 44.

19- Oyston, P.C., Payne, D.W., Havard, H.L., Williamson, E.D., and Titball, R.W., 1998. Production of a non-toxic site-directed mutant of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin which induces protective immunity in mice, Microbiology, 44, PP: 333-341.

20-Payne, D.W., Williamson, E.D., Havard, H., Modi, N., and Brown, J., 1994. Evaluation of a new cytotoxicity assay for *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin, FEMS Microbiology Letters, 116, PP: 161-167.

21-Petit, L., Gibert, M., Gourch, A., Bens, M., Vandewalle, A., and Popoff, M.R., 2003. *Clostridium perfringens* epsilon toxin rapidly decreases membrane barrier permeability of polarized MDCK cells, Cell Microbiology, 5, PP: 155-164.

22- Petit, L., Maier, E., Gibert, M., Popoff, M.R., and Benz, R., 2001. *Clostridium perfringen*s epsilon toxin induces a rapid change of cell membrane permeability to ions and forms channels in artificial lipid bilayers, Journal of Biological Chemistry, 276, PP: 15736-15740.

23- Pless, D.D., Torre, E. R., Reinke, E.K., and Bavari, S., 2001. High-affinity, protective antibodies to the binding domain of botulinum neurotoxin type A, Infectious Immunology, 69, PP: 570-574.

24- Rosskopf-Streicher, U., Volkers, P., and Werner, E., 2003. Control of *Clostridium perfringens* vaccines using an indirect competitive ELISA for the epsilon toxin component-examination of the assay by a collaborative study, Pharmeuropa Biol, PP: 91-96.

25- Sayeed, S., Fernandez-Miyakawa, M.E., Fisher, D.J., Adams, V., Poon, R., Rood, J.I., Uzal, F.A., and McClane, B.A., 2005. Epsilon-toxin is required for most *Clostridium perfringens* type D vegetative culture supernatants to cause lethality in the mouse intravenous injection model. Infectius Immunology, 73, PP: 7413-7421.

26- Shimamoto, S., Tamai, E., Matsushita, O., Minami, J., Okabe, A., and Miyata, S., 2005. Changes in ganglioside content affect the binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to detergent-resistant membranes of Madin-Darby canine kidney cells. Microbiology and Immunology, 49, PP: 245-253.

27- Shortt, S.J., Titball, R.W., and Lindsay, C.D., 2000. An assessment of the in vitro toxicology of *Clostridium perfringens* type D epsilon-toxin in human and animal cells, Human and Experimental Toxicology, 19, PP: 108-116.

28- Sidorenko, G.I., 1967. Data on the distribution of *Clostridium perfringens* in the environment of man, Communication1, *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology*,11, PP: 171-177.

29- Soler-Jover, A., Blasi, J., de Aranda, I., G., Navarro, P., Gibert, M., Popoff, M.R., and Martin-Satue, M., 2004. Effect of epsilon toxin-GFP on MDCK cells and renal tubules in vivo, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52, PP: 931-942.

30- Songer, J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals, Clinical Microbiolgy Review, 9, PP: 216-234.

31- Uzal, F.A., Kelly, W.R., Morris, W.E., Bermudez, J., and Baison, M., 2004. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16, PP: 403-411.

# Monoclonal antibodies responses against epsilon enterotoxin of *Clostridium perfringens* by macro techniques culture

**Sadri R.**

**Research and Diagnosis of Animal Viral Diseases Dept. , Razi Vaccine and Serum Research Institute Agricultural, Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj , I.R. of Iran**

## Abstract

*Clostridia pererfringens* is anaerobic bacteria with secretion epsilon toxin that causes lethal enterotoxaemia in animals. In this study, cytotoxicity effects of two monoclonal neutralizing antibodies 4D7 and 5B7 were evaluated against epsilon toxin using an *in vitro* technique with staining MDCK cell culture. The effects of inhibitory of two monoclonal antibodies neutralize epsilon toxin of *clostridia* that were cultured on Madin Derby canine Kidney cells, MDCK cells by staining 7-actinodiamine dye. It was showed that the two neutralizing antibodies inhibited the pore forming activity of epsilon toxin and reduced the epsilon toxin bound to MDCK cells a**t** $4^{o}$C. Epitopes, the two major 134, 145 amino acids were recognized by antibodies that neutralized the activities of epsilon toxin, By Competitive ELISA and microarray tests via that monoclonal antibody 4D7 were also diagnosed and analyzed134 and 145 epitopes It was shown that an amphipathic protein molecule was coated with toxin membrane. Therefore, this valuable information may be used in the development antitoxin therapies in the near future time.

**Key words:** *Clostridia pererfrigens*, Epsilon toxin, Monoclonal antibody