دانشگاه شهید چمران اهواز
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی
پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

عنوان:

تولید آنتی ژن حفاظت کنندهٔ *باسیلوس آنتراسیس* با استفاده از تکنیک بیان پروتئین های نوترکیب

نگارش:
وحید باقری

به راهنمایی:
دکتر حسین معتمدی

مشاور:
دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری

یکشنبه ساعت ۱۰ صبح- تالار دانش

اسفند ماه ۱۳۸۷

نام خانوادگی : باقری نام : وحید
عنوان پایان نامه : تولید آنتی ژن حفاظت کننده *باسیلوس آنتراسیس* با استفاده از تکنیک بیان پروتئین های نوترکیب
استاد راهنما : دکتر حسین معتمدی استاد مشاور: دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته تحصیلی: زیست شناسی گرایش: میکروبیولوژی
محل تحصیل (دانشگاه) : شهید چمران اهواز دانشکده : علوم
تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۸۷/۱۲/۱۸ تعداد صفحات:۹۱
کلید واژه ها : *باسیلوس آنتراسیس*، آنتی ژن حفاظتی، کلونینگ، پروتئین نوترکیب، pMAL-c2X
سیاه زخم توسط باکتری گرم مثبت و اسپوردار *باسیلوس آنتراسیس*، ایجاد می شود. سم سیاه زخم از سه پروتئین آنتی ژن حفاظتی(PA)، فاکتور کشنده(LF) و فاکتور ادم(EF)، ساخته می شود. واکسن های کنونی علیه سیاه زخم،از PA بعنوان جزء اصلی خود استفاده می کنند، چونکه PA ایمنی حفاظتی ایجاد می کند. ایمنی زایی با این واکسن ها ممکنست که اثرات جانبی را القا کند و به منظور حفظ ایمنی، نیاز به چندین دوز یادآور می باشد. بنابراین به یک واکسن پیشرفته، ایمن، مؤثر و ارزان علیه سیاه زخم نیاز است. هدف از این تحقیق کلون و بیان ژن آنتی ژن حفاظتی *باسیلوس آنتراسیس* بصورت پروتئین فیوژن با MBP در باکتری *E.coli* بود. ژن آنتی ژن حفاظتی در وکتور pMAL-c2X کلون گردید و این ساختار در سویه میزبان *E.coli* DH5α بیان شد. بیان آنتی ژن توسط روش های SDS-PAGE و وسترن بلات نشان داده شد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که پلاسمید نوترکیب pMAL-c2X، آنتی ژن حفاظتی را بصورت کارا بیان می کند و می توان از آن بعنوان یک حامل مناسب جهت تولید آنتی ژن PA به منظور استفاده در کیت های تشخیصی و نیز واکسیناسیون استفاده کرد.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول : مقدمه	۱
فصل دوم : مروری بر منابع موجود	۵
۲- ۱- *باسیلوس آنتراسیس*	۶
۲-۱-۱- تعریف	۶
۲-۱-۲- طبقه بندی	۶
۲-۱-۳- مشخصات باکتری شناسی	۷
۲-۲- بیماری	۸
۲-۲-۱- اپیدمیولوژی	۸
۲-۲- ۲- بیماریزایی	۹
۲-۲-۳- اشکال بیماری	۱۱
۲-۲-۳-۱- سیاه زخم پوستی	۱۱
۲-۲-۳-۲- سیاه زخم تنفسی	۱۲
۲-۲-۳-۳- سیاه زخم گوارشی	۱۳
۲-۲-۴- ساختار و عملکرد سم سیاه زخم	۱۳
۲-۲-۴-۱- ساختار و عملکرد آنتی ژن حفاظتی	۱۴
۲-۲-۴-۲- ساختار و عملکرد فاکتور ادم	۱۷
۲-۲-۴-۳- ساختار و عملکرد فاکتور کشنده	۱۸
۲-۲-۵- تشخیص آزمایشگاهی	۲۰

۲-۲-۶- درمان ۲۱
۲-۲-۷- کنترل عفونت ۲۲
۲-۲-۸- واکسیناسیون ۲۳
۲-۲-۸-۱- واکسنهای در حال توسعه ۲۵
۲-۲-۹- ایمونیزاسیون غیر فعال و نقش آنتی بادیها در حفاظت علیه سیاه زخم ۲۹
۲-۲-۱۰- انتقال داخل سلولی پپتیدها از طریق الحاق ژنتیکی با سم سیاه زخم ۳۱
۲-۲-۱۱- سیاه زخم بعنوان یک سلاح بیوتروریسم ۳۲
۲-۳- مروری بر سایر مطالعات ۳۴
فصل سوم : مواد و روش کار ۳۵
۳-۱- مواد و وسایل ۳۶
۳-۱-۱- مواد ۳۶
۳-۱-۲- وسایل ۳۸
۳-۱-۳- کیت ها ۳۹
۳-۱-۴- آنزیم ها ۳۹
۳-۱-۵- آنتی بادیها ۳۹
۳-۱-۶- آنتی یبوتیک ها ۳۹
۳-۱-۷- سویه های باکتریایی ۳۹
۳-۲- مواد تشکیل دهنده و طرز تهیه بافرها و محلولها ۴۰
۳-۲-۱- بافرها ۴۰
۳-۲-۲- محلولها ۴۲

۳-۳- مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل آگارز و پلی اکریل آمید ۴۴
۳-۴- طرز تهیه محیط های کشت ۴۶
۳-۵- روش کار ۴۷
۳-۵-۱- مراحل انجام تحقیق ۴۷
۳-۵-۲- استخراج توالی ژن از بانک ژن و طراحی پرایمر ۴۷
۳-۵-۳- استخراج پلاسمید از *باسیلوس آنتراسیس* ۴۹
۳-۵-۴- PCR ۵۰
۳-۵-۵- بررسی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۵۲
۳-۵-۶- خالص سازی محصول PCR ۵۳
۳-۵-۷- تکثیر و خالص سازی وکتور ۵۳
۳-۵-۷-۱- ترانسفورماسیون ۵۴
۳-۵-۷-۲- استخراج پلاسمید ۵۵
۳-۵-۸- هضم آنزیمی ژن و وکتور و خالص سازی محصولات هضم شده ۵۶
۳-۵-۹- اتصال و ترانسفورماسیون ۵۷
۳-۵-۱۰- غربالگری کلونی ها از لحاظ وجود پلاسمید دارای ژن ۵۸
۳-۵-۱۰-۱- PCR بر روی باکتریهای دارای پلاسمید ۵۸
۳-۵-۱۰-۲- هضم آنزیمی ۵۹
۳-۵-۱۱- بررسی بیان پروتئین ۵۹
۳-۵-۱۱-۱- القای بیان پروتئین توسط IPTG ۵۹
۳-۵-۱۱-۲- SDS-PAGE ۶۰
۳-۵-۱۱-۳- وسترن بلات ۶۲

فصل چهارم : نتایج ۶۵

۴-۱- استخراج توالی ژن از بانک ژن و طراحی پرایمر ۶۶

۴-۲- استخراج پلاسمید pXO1 و PCR ۶۶

۴-۳-تکثیر و خالص سازی وکتور ۶۷

۴-۴- هضم آنزیمی ژن و وکتور ۶۸

۴-۵- ورود ژن بداخل وکتور و تأیید صحت آن ۶۹

۴-۵-۱- استخراج پلاسمید به روش Miniprep ۶۹

۴-۵-۲- PCR بر روی باکتریهای دارای پلاسمید ۷۰

۴-۵-۳- هضم آنزیمی ۷۱

۴-۶- بیان پروتئین PA ۷۲

۴-۶-۱- SDS-PAGE ۷۲

۴-۶-۲- وسترن بلات ۷۳

فصل پنجم : بحث و پیشنهادات ۷۵

۵-۱- بحث ۷۶

۵-۲-پیشنهادات ۸۱

منابع ۸۲

فهرست جداول

جدول ۳-۱- برنامه PCR ۵۲

فهرست تصاویر

تصویر۲-۱- ساختار مولکولی آنتی ژن حفاظتی ۱۴

تصویر۲-۲- ساختار مولکولی هپتامر آنتی ژن حفاظتی ۱۶

تصویر ۲-۳- مکانیسم عملکرد سم سیاه زخم ۱۷

تصویر۲-۴- ساختار مولکولی فاکتور ادم ۱۸

تصویر۲-۵- ساختار مولکولی فاکتور کشنده ۱۹

تصویر ۳-۱- توالی ژن آنتی ژن حفاظتی ۴۸

تصویر ۳-۲- نقشه وکتور pMAL-c2X ۵۴

تصویر ۴-۱- محصول PCR ۶۷

تصویر ۴-۲- محصول استخراج پلاسمید با کیت و پلاسمید هضم شده ۶۸

تصویر ۴-۳- استخراج پلاسمید با روش Miniprep ۶۹

تصویر۴-۴- محصول PCR بر روی کلونی ها ۷۰

تصویر ۴-۵- هضم آنزیمی بر روی پلاسمیدها ۷۱

تصویر ۴-۶- SDS-PAGE ۷۳

تصویر ۴-۷- وسترن بلات ۷۴

باسیلوس آنتراسیس[1] عامل بیماری سیاه زخم[2] و از جنس باسیلوس می باشد. این باکتری باسیل گرم مثبت، هوازی و اسپوردار است که اولین بار توسط رابرت کخ[3] در سال ۱۸۷۷ جداسازی شد. سیاه زخم ترجیحاً بیماری حیوانات علف خوار به ویژه گاو و گوسفند می باشد و انسان به طور تصادفی از طریق تماس با حیوانات مبتلا یا محصولات آنها آلوده می شود. افرادی مانند قصاب ها، گله داران و کارگران کارخانه های چرم، مو و پشم که به نوعی با دام و فراورده های دامی سروکار دارند افراد در معرض آلودگی هستند. سه راه بروز آلودگی در انسان پوستی، تنفسی و خوراکی است. سیاه زخم پوستی شایع ترین شکل سیاه زخم در انسان است که در نهایت موجب ایجاد یک جوشگاه سیاه رنگ می شود. سیاه زخم تنفسی که در نتیجه ی تنفس اسپور باکتری رخ می دهد کشنده ترین فرم بیماری محسوب شده و موجب مرگ بیمار در مدت زمان ۲۴ ساعت می شود. سیاه زخم گوارشی ناشی از مصرف غذای آلوده به اسپور و نادرترین فرم بیماری در انسان است. در انسان تقریباً ۹۵ درصد از موارد ابتلا به سیاه زخم از نوع جلدی و ۵ درصد از موارد به شکل تنفسی است.

باسیلوس آنتراسیس دارای دو فاکتور اصلی بیماریزایی است که شامل یک اگزوتوکسین پروتئینی سه جزئی و یک کپسول پلی – D- گلوتامیک اسیدی است که به ترتیب توسط پلاسمیدهای pXO1 و pXO2 کد می شوند. اجزای توکسین سیاه زخم شامل آنتی ژن حفاظتی[4] (PA)، فاکتور کشنده[5] (LF) و فاکتورادم[6] (EF) است. هیچ یک از این سه جزء به تنهایی سمی نیستند، اما ترکیب LF با PA یا EF با PA منجر به بیماریزایی می شود. PA به عنوان ضروری ترین

1 - *Bacillus anthracis*
2 - Anthrax.
3 - Robert koch.
4 - Protective antigen
5 - Lethal factor
6 - Edema factor

جزء برای واکسیناسیون علیه سیاه زخم محسوب می شود. واکسن جذب شده سیاه زخم[۷] (AVA) تنها واکسن سیاه زخم انسانی دارای مجوز در آمریکاست که از یک عصاره فاقد سلول از محیط کشت باکتری تهیه می شود. این عصاره حاوی مخلوطی از محصولات سلولی شامل PA است که به وسیله هیدروکسید آلومینیوم جذب شده است. واکسن موجود در روسیه از اسپورهای زندهٔ سویهٔ استرن[۸] تهیه می شود و واکسن موجود در انگلستان عصاره کشت فاقد سلول است که توسط زاج رسوب داده شده است. تمامی واکسن های ذکر شده به علت اثرات جانبی نامطلوب مانند درد، ادم و قرمزی ایمن محسوب نمی شوند و برای حفظ ایمنی به دوزهای یادآور نیاز دارند. علاوه بر این استفاده از این باکتری در حملات بیوتروریستی (مانندحملات سال ۲۰۰۱ آمریکا) و نگرانی ها در مورد پتانسیل استفاده از این باکتری در جنگ زیستی بر این موضوع تأکید دارند که یک واکسن انسانی پیشرفته، مؤثر و ارزان علیه سیاه زخم ضروری است.

PA طبیعی و یا نوترکیب پاسخ های بالای آنتی بادی را ایجاد می کند، بنابراین PA می تواند برای تکامل یک واکسن زیر واحدی نوترکیب مؤثر علیه سیاه زخم استفاده شود. بعلاوه به علت سطح پایین تولید PA در *باسیلوس آنتراسیس* و دشواری جداسازی آن از دیگر اجزاء توکسین، تحقیقات با هدف وارد کردن ژن PA به دیگر گونه های باکتریایی انجام گرفته تا مقادیر بالاتری از PA تولید شود.

هدف از این تحقیق کلونینگ و بیان ژن آنتی ژن حفاظتی عامل سیاه زخم در باکتری *اشریشیا کلی*[۹] و نیز بومی سازی تکنیک تولید آن در داخل کشور است. با توجه به عدم تولید واکسن انسانی

7 - Anthrax vaccine adsorbed
8 - Sterne
9 - *Escherichia coli*

سیاه زخم در کشور، با اجرای این تحقیق و مطالعات تکمیلی مانند خالص سازی آنتی ژن و سنجش ایمنی زایی آن، امید است امکان تولید آنتی ژن نوترکیب در مقیاس صنعتی جهت واکسیناسیون انسان و تولید آنتی بادی در کشور فراهم گردد. علاوه بر این، آنتی ژن تولید شده جهت کیت های تشخیصی نیز کاربرد دارد.

۲-۱- *باسیلوس آنتراسیس*

۲-۱-۱- تعریف

باسیلوس آنتراسیس باکتری گرم مثبت میله ای، اسپوردار و هوازی است که اولین بار در دهه ۱۸۷۰ توسط کخ جداسازی شد. این باکتری عامل بیماری خطرناک سیاه زخم می باشد که بیماری مشترک بین دام و انسان است.

۲-۱-۲- طبقه بندی

جنس باسیلوس شامل گروه بزرگی از باکتری های میله ای شکل گرم مثبت دارای اسپور است که دارای انواع هوازی و بی هوازی اختیاری می باشند. تنها، گونه آنتراسیس عامل بیماری مهم در انسان و سایر پستانداران است. چندین گونه دیگر این جنس در طبیعت انتشار وسیعی داشته و در اغلب آبها، خاکها و گرد و غبار وجود دارند. توجه زیادی به گونه های این جنس بویژه *باسیلوس آنتراسیس* معطوف شده است، زیرا این گونه و گونه های دیگر علاوه بر بیماریزایی از لحاظ اقتصادی حائز اهمیت اند. یکی از مشخصات بارز این جنس دامنهٔ وسیع مقدار درصد گوانین- سیتوزین DNA در گونه های مختلف می باشد که از ۳۲ تا ۶۲ مول درصد متغیر است. این دامنه وسیع منعکس کننده ی ناهمگنی گونه ها در این جنس است. باسیلوس ها از نظر نوع متابولیسم، نیازهای غذایی و ترکیب و ساختار دیواره ی سلولهای رویشی متنوع اند. در این جنس گونه های سایکروفیل، مزوفیل و ترموفیل، همچنین آلکالوفیل، اسیدوفیل و نوتروفیل دیده می شوند. در رده بندی آنها علاوه بر صفات

فیزیولوژیک و شکلی، ترکیب محیط کشت، PH ، درجه حرارت انکوباسیون، اندازه، شکل و موقعیت اسپور و قدرت بیماریزایی نیز در نظر گرفته می شود(۲).

۲-۱-۳- مشخصات باکتری شناسی

باسیلوس آنتراسیس باسیل بزرگ، گرم مثبت، هوازی، اسپوردار و با اندازه ۱۰-۳×۱/۵-۱ میکرومتر است (۸). اسپور باکتری بیضوی تا استوانه ای شکل است که به صورت مرکزی درون باکتری قرار می گیرد. این باکتری غیر متحرک، کاتالاز مثبت و روی آگار خوندار[1] غیر همولیتیک بوده و توسط باکتریوفاژ گاما لیز می شود. سلول ها غالباً به صورت زنجیره های بلند آرایش پیدا می کنند. معمولاً زنجیره های اشکال حاد[2] دارای کپسول هستند ولی اشکال غیر حاد معمولاً فاقد کپسول هستند.

اسپورزایی در خاک و روی محیط کشت صورت می گیرد، اما در بافتهای میزبان رخ نمی دهد، مگر اینکه در معرض هوا قرار گیرند. با اتمام مواد غذایی اسپورهای مقاومی تشکیل می شوند که می توانند برای دهها سال در خاک زنده بمانند. *باسیلوس آنتراسیس* در مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای $35^{\circ}c$ بر روی آگار خوندار به خوبی رشد می کند. کلنی های آن مات، سفید مایل به خاکستری رنگ، با ۴ تا ۵ میلی متر قطر و با حاشیه نامنظم هستند (۷۱ و ۶۲).

باکتریها در خون یا بافت های آلوده، توسط کپسول پلی پپتیدی احاطه می شوند که اگر با پلی کروم متیلن بلو یا جوهر هندی رنگ آمیزی شوند، در زیر میکروسکوپ دیده می شوند. در گسترش های

[1] - Blood agar
[2] - Virulent

رنگ آمیزی شده از کلنی های تکثیر یافته روی محیط های کشت، کپسولی وجود ندارد، مگر اینکه محیطها حاوی ۰/۷ درصد بیکربنات یا ۵ درصد سرم باشند و در ۱۰-۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شوند (۸۴).

۲-۲- بیماری

۲-۲-۱- اپیدمیولوژی

سیاه زخم بیماری حیوانات علف خوار (گوسفند، بز، گاو و خوک) است. دامهای اهلی بعد از چریدن روی علوفه آلوده به اسپور، به سیاه زخم گوارشی دچار می شوند. بعد از آلودگی یک مرتع، ممکن است سیاه زخم برای سالها در محیط باقی بماند. به نظر می رسد پایداری محیطی به تعدادی از عوامل شامل سطوح بالای نیتروژن و ماده آلی خاک، PH بالاتر از ۶ و دمای بالاتر از $15^{\circ}c$ وابسته باشد. توانایی تشکیل اسپور به باکتری اجازه می دهد که شرایط محیطی و ضد عفونی کننده ها که اکثر باکتریها را تخریب می کنند، تحمل کند (۹۲و۷۵). موارد انسانی سیاه زخم به طور معمول در دو گروه کشاورزی و صنعتی قرار می گیرند. موارد کشاورزی شامل کارگرانی هستند که در تماس مستقیم با حیوانات آلوده قرار دارند (چوپانان، قصابها و کارکنان کشتارگاه) و موارد صنعتی شامل افرادی است که با محصولات حیوانی آلوده تماس دارند، بویژه کارکنان شاغل در کارخانجات فراوری مو و پودر استخوان.

آفریقای غربی آلوده ترین ناحیه دنیاست (۸۷ و۲۳). همچنین سیاه زخم در دیگر بخش های آفریقا، آمریکای مرکزی، اسپانیا، یونان، ترکیه، آلبانی، رومانی، آسیای مرکزی و خاور میانه نیز یک

مشکل مهم محسوب می شود (۳۸). تخمین زده می شود سالیانه بین ۲۰/۰۰۰ تا ۱۰۰/۰۰۰ مورد سیاه زخم در دنیا رخ می دهد (۲۱). اپیدمی سیاه زخم انسانی در زیمبابوه در سال ۱۹۷۸ تا ۱۹۸۰ و در سوردلوسک [۳] (در شوروی سابق) در ۱۹۷۹ رخ داده است. اپیدمی زیمبابوه بدنبال شیوع بیماری گاوی با حدود ۱۰/۰۰۰ مورد که تقریباً همه عفونتها پوستی بودند، رخ داد که ناشی از قطع درمان دامها در طی جنگ داخلی بود. در سال ۱۹۷۹ بعد از یک انفجار در یک آزمایشگاه در شوروی سابق، آئروسولی تولید شد که منجر به ۶۴ مورد مرگ شد. در کشورهای در حال توسعه سیاه زخم انسانی در مناطق همه گیر در دامها رایج تر است. در کشورهایی که از لحاظ اقتصادی پیشرفته هستند، سیاه زخم حیوانی کنترل شده است و سیاه زخم تنها گاهی اوقات بین انسانها رخ می دهد. وقوع عفونت با واکسیناسیون حیوانات و افراد در خطر بالا، همراه با پیشرفت بهداشت صنعتی، بطور چشمگیری کاهش یافته است. در ایالات متحده در اوایل قرن بیستم وقوع سالیانه تنها ۱۲۷ مورد بود که بعداً به کمتر از یک مورد در هر سال رسید (۶۴).

۲-۲-۲- بیماریزایی

باسیلوس آنتراسیس دارای دو عامل اصلی حدت[۴] است که توسط دو پلاسمید pXO1 و pXO2 حمل می شوند. پلاسمید pXO1 (۱۸۴kb) ژنهای لازم برای توکسین ترشحی را کد می کند که این توکسین مسئول کشتن سلول و مرگ میزبان است. پلاسمید pXO2 (۹۰kb) ژنهایی را کد می کند که کپسول پلی – D –گلوتامیک اسید را تولید می کنند که از فاگوسیتوز باکتری جلوگیری

[3] - Sverdlovsk.
[4] - Virulence factor

می کند (۵۵). سویه هایی که فاقد هر یک از پلاسمید ها باشند تضعیف شده یا فاقد حدت هستند و حدت کامل باکتری به حضور کپسول ضد فاگوسیتوز و اجزای توکسین ترشحی وابسته است (۹۶).

در خارج از بدن تولید کپسول در حضور دی اکسید کربن بالا (۵ درصد یا بالاتر) و اضافه کردن بی کربنات یا سرم تشدید می شود. جدایه هایی[5] از باکتری که فاقد کپسول هستند، بطور کلی حدت پایینی دارند و بعنوان واکسن برای ایمنی زایی دردامهای اهلی(و انسان در برخی از کشورها) استفاده می شوند. آنزیم های مرتبط با غشا که در سنتز کپسول پلی گلوتامیک اسیدی نقش دارند توسط ژنهای capA ، capB ، capC و dep کد می شوند که این ژنها روی پلاسمید pXO2 قرار دارند (۶۶ و ۶۱). برای مثال سویه استرن فاقد کپسول و دارای توکسین است (فاقد پلاسمیدpXO2)، که توانایی اش برای کشتن حیوانات کاهش یافته و حدت باقیماندهٔ آن به علت تولید توکسین است (۹۳).

پلاسمید تولید کننده توکسین (pXO1) ژنهای ساختاری را برای آنتی ژن حفاظتی (PA)، فاکتور ادم (EF) و فاکتور کشنده (LF) را کد می کند (بترتیب توسط ژن های pagA، cya و lef). این اجزا در ترکیب های دوگانه، سموم کشنده (PA+LF=LeTx) و ادم (PA+EF=EdTx) را تشکیل می دهند. PA جزء متصل شونده به سلول است که با EF یا LF بر همکنش می دهد و آنها را وارد سلول میزبان می کند. سویه های جهش یافته که همراه با اختلال در بیان EF یا LF هستند، به وضوح اثبات می کنند که LeTx برای عفونت های کشنده مورد نیاز است، در حالیکه ادم پوست به EdTx نسبت داده می شود. بیان این توکسین ها بعد از اینکه اسپورها به میزبان تلقیح شدند و به محض جوانه زنی اسپورها در ماکروفاژها و رشد رویشی باسیل ها رخ می دهد (۷۳ و ۶۷).

[5] - Isolates

۲-۲-۳- اشکال بیماری

۲-۲-۳-۱- سیاه زخم پوستی[6]

بیش از ۹۰ درصد از موارد سیاه زخم که در انسان ها بطور طبیعی بروز کرده، فرم پوستی داشته است. سیاه زخم در جایگاه تلقیح اسپورها در پوست از طریق بریدگی یا شکاف در پوست ایجاد می شود که معمولاً از طریق تماس با لاشه ها یا حیوانات آلوده و یا محصولات آنها (مانند مو) منتقل می شود و بندرت ممکن است عفونت بوسیله نیش زدن مگس هایی که قبلاً روی اجساد آلوده به سیاه زخم تغذیه داشته اند منتقل شود (۲۵).

دوره نهفتگی[7] معمولاً ۳-۲ روز است، اگر چه اولین علائم کلینیکی می تواند در ظرف ۱۲ ساعت و حداکثر دو هفته بعد از تماس ظاهر شوند. اکثر موارد در نواحی در معرض، روی بازوها و دست ها و بدنبال آن صورت و گردن رخ می دهند. بیماری ممکن است بصورت موضعی باقی بماند، اما برخی از بیماران علائم عمومی[8] را نشان می دهند. سیاه زخم پوستی بصورت یک پاپول بدون درد و خارش در جایگاه تلقیح شروع می شود و سپس به یک وزیکول تبدیل شده که نکروز شده و به یک جوشگاه[9] سیاه، ادم دار و بدون درد تبدیل می شود که در عرض ۲-۱ هفته بر طرف می شود. بیشتر موارد سیاه زخم پوستی بطور خود به خود بهبود می یابند. بهبودی معمولاً منجر به تشکیل جوشگاه می شود و ممکن است به جراحی ترمیمی نیاز باشد. به نظر نمی رسد درمان آنتی بیوتیکی پیشرفت

6 - Cutaneous anthrax
7 - Incubation period
8 - Systemic
9 - Scar

طبیعی زخم را تغییر دهد، ولی ایجاد ادم و علائم عمومی را کاهش داده یا مهار می کند. میزان مرگ و میر بدون درمان آنتی بیوتیکی ۲۰ درصد و با درمان کمتر از یک درصد است (۴۷ و ۱۴).

۲-۲-۳-۲- سیاه زخم تنفسی[10]

کشنده ترین فرم سیاه زخم، تنفسی است که ناشی از استنشاق اسپورهایی است که توسط هوا انتقال می یابند. حداقل دوز عفونی کننده تعیین نشده است، اما سازمان دفاع آمریکا تخمین زده است که دوز کشنده برای انسان تقریباً ۸/۰۰۰ تا ۱۰/۰۰۰ اسپور است. کشندگی سیاه زخم تنفسی از پیشرفت سریع علائم شبه آنفلوانزا تا سپتمی سمی[11] سراسری و از کارافتادگی اندامها ناشی می باشد. اسپورها ممکن است برای دوره های طولانی در ریه بصورت نهفته باقی بمانند. علائم کلینیکی ابتدایی متمایز نیستند که شامل تب، سرفه و بیقراری که این علائم به سمت سیانوز و ناراحتی تنفسی و در نهایت شوک عفونی، کما و مرگ پیشرفت می کند. میزان مرگ و میر علی رغم درمان با آنتی بیوتیک های مناسب بسیار بالاست (۸۶ و ۳۷). مدل کنونی پیشرفت سیاه زخم تنفسی، نقش اصلی برای ماکروفاژهای آلوئولی قائل است که اسپورهایی را که در ریه ته نشین شده اند می بلعند. سپس از طریق مجاری لنفی به گره های لنفی مدیاستینال[12] مهاجرت می کنند و اسپورها در فاگوزومها جوانه می زنند. اسپورهایی که جوانه زده اند سلول های میزبان را لیز می کنند و باکتری وارد گردش عمومی خون شده و توکسین تولید می کند (۳۰).

---

10 - Inhalational anthrax
11 - Septicemia
12 - Mediastinal

۲-۲-۳-۳- سیاه زخم گوارشی[۱۳]

سیاه زخم گوارشی نادرترین شکل سیاه زخم است و عقیده بر این است که ناشی از خوردن گوشت آلوده است که به میزان کافی پخته نشده است. اگر چه شکل گوارشی در کشورهای توسعه یافته فوق العاده نادر است ولی میزان مرگ و میر بسیار بالایی دارد. بیماری ۲ تا ۵ روز بعد از خوردن گوشت آلوده شروع می شود و در نهایت به سمت توکسمی[۱۴] و شوک پیشرفت کرده و بدنبال آن مرگ حادث می شود، مگر اینکه درمان به موقع شروع شود (۸۶ و ۶۳ و۵۴).

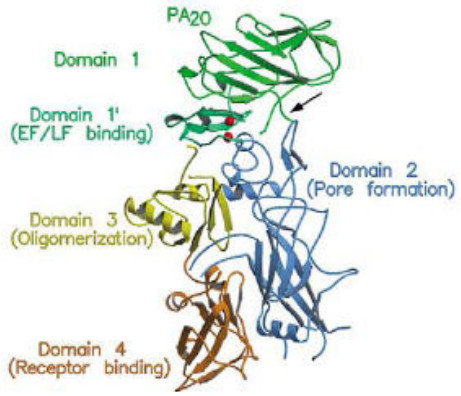
۲-۲-٤- ساختار و عملکرد توکسین سیاه زخم

توکسین *باسیلوس آنتراسیس* متعلق به خانواده سموم دو تایی A-B است. بخش A در سیتوپلاسم سلولهای هدف عمل می کند و بخش B به سلولهای هدف متصل شده و بخش A را به دورن سیتوپلاسم جابه جا می کند. این توکسین از یک واحد (PA)B و دو زیر واحد A(EF,LF) تشکیل شده است. اگر چه جزئیات ورود سم در حال روشن شدن است، ولی رویدادهای متوالی که منجر به مرگ میزبان می شوند ناشناخته باقی مانده است (۵).

[13] - Gastrointestinal anthrax
[14] - Toxemia

۲-۲-٤-۱- ساختار و عملکرد آنتی ژن حفاظتی (PA)

PA بدلیل القای آنتی بادی های حفاظتی علیه LeTx و EdTx و استفاده اش در واکسن ها، این چنین نام گذاری شده است و جزء اصلی توکسین پروتئینی سه قسمتی ترشح شده توسط *باسیلوس آنتراسیس* است. PA پروتئین ۷۳۵ آمینواسیدی است (۸۲/۶۸ kDa) که بصورت PA۸۳ نیز شناخته می شود (۵). PA مونومری دارای چهار دومین[۱۵] ساختاری است که اکثراً از صفحات بتای غیر موازی تشکیل شده اند. هر دومین برای یک مرحله خاص در عملکرد توکسین مورد نیاز است (تصویر ۲-۱)



تصویر ۲-۱- ساختار مولکولی آنتی ژن حفاظتی (۵)

دومین ۱ (آمینو اسیدهای ۲۵۸-۱) حاوی دو یون کلسیم و جایگاه شکست برای پروتئازهای فعال کننده است. دومین ۲ (آمینواسیدهای ۴۸۷-۲۵۹) دارای یک حلقه انعطاف پذیر بزرگ است که

[15] - Domain

گمان می رود در تشکیل منفذ درون غشایی نقش داشته و کانالهای انتخابی کاتیون را در غشاهای ساختگی و غشاهای سلولی ایجاد می کند (۶۹ و ۲۸).

دومین ۳ (آمینواسیدهای ۵۹۴-۴۸۸) کوچکترین دومین است و در تشکیل هپتامر (الیگومریزاسیون) نقش دارد. دومین ۴ (آمینو اسیدهای ۷۳۵- ۵۹۵) در انتهای کربوکسیل مولکول قرار گرفته و به ATR [16] (گیرنده سم سیاه زخم) متصل می شود. حذف ها یا جایگزینی های کوتاه آمینو اسیدی در انتهای کربوکسیل، برهمکنش PA با گیرنده اش را مختل کرده یا کاهش می دهد (۸۹ و ۷۲). بعد از اینکه PA به ATR روی سطح سلول متصل شد، توسط یک پروتئاز شبه فورین[17] شکسته شده و فعال می شود. شکست آنزیمی PA در دومین ۱ رخ می دهد و منجر به رهایی قطعهٔ N-ترمینال PA (PA20) به محیط خارج سلولی می شود. PA20 نقشی در عملکرد توکسین ندارد. این شکست برای فعالیت توکسین ضروری است،

بطوریکه PA دارای جهش در جایگاه شکست، فاقد اثرات سمی برای ماکروفاژهای موشی است. از دست دادن PA20 منجر می شود تا قطعه C-ترمینال PA (PA۶۳) بصورت هپتامرهای متقارن حلقه ای شکل تجمع یابد (تصویر ۲-۲).

[16] - Anthrax toxin receptor
[17] - Furin-like