Journal of Police Medicine

Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 183-192

Original Article

Evaluation of Data Competency Achieved from Double Sandwich ELISA Method for the Detection of Botulinum Toxin Type E

Received: 7 October 2013 **Revised:** 4 December 2013 **Accepted:** 7 December 2013

Mohammad Ebrahim Minaei[1*]
Mojtaba Saadati[2]

[1]Ph.D student in Nanobiotechnology, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.
[2]Professor, Faculty of Basic Science, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Mohammad Ebrahim Minaei

Tel : (+98) 9352219503

Email: ebimomi@gmail.com

ABSTRACT

Background: Botulinum toxin is known as the most potent toxin that that can cause death even in small amounts, on the other hand, except antitoxin, there are no drug for toxicity. Therefore, diagnostic methods that can detect very small amounts of botulinum toxin in a short time, are very important. The aim of this study was to evaluate the modified double sandwich ELISA method for detection limit, repeatability and cross-reactivity for the detection of botulinum toxin type E.

Materials and Methods: Double-sandwich ELISA method require two antibodies that bind to epitopes without interference on antigens. For this purpose, we poured the rabbit antibody at down (Capture antibody) and mouse antibody at high toxin (Detection antibody) into the each wells and titered toxin from the first well. Then, for adjusting and optimizing the sandwich ELISA system Cross reactivity and Reproducibility tests were performed.

Results: Double-sandwich ELISA method is able to detect value of 1 ngbotulinum toxin type E.Reproducibility of this method was optimum through experiments repeated three times in one day and four times in different days and is negligible cross it's reactivity with toxin type B and Tetanus was insignificant.

Conclusion: So far, several methods based on serological assessment of botulinum toxin have been presented, but ELISA, has been the best and most practical method. To improve sensitivity of assessment, several modified ELISA methods have been presented that double-sandwich ELISA is the most advanced one . This method is rapid, highly specific and it's sensitivity is equivalent to testing on mice. The method is used for determining specific antigen in the unknown sample.

Key words: clostridium botulinum,double sandwich ELISA, botulinum toxin type E

پاییز۱۳۹۲ – دوره ۲ – شماره ۳– صفحات ۱۹۲-۱۸۲

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

بررسی شایستگی داده‌های روش دابل ساندویچ الایزا برای تشخیص توکسین بوتولینوم تیپ E

تاریخ دریافت: ۱۵ مهر ۱۳۹۲ **تاریخ اصلاح:** ۱۳ آذر ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۶ آذر ۱۳۹۲

چکیده

محمد ابراهیم مینایی[1*]

مجتبی سعادتی[2]

مقدمه: توکسین بوتولینوم به عنوان قویترین توکسین معرفی شده و مقدار اندک آن موجب مرگ افراد می‌شود، بنابراین روش تشخیصی که بتواند توکسین بوتولینوم را سریع و دقیق شناسایی نماید، بسیار اهمیت دارد. این مطالعه با هدف، بررسی روش اصلاح شده دابل ساندویچ الایزا از نظر حد تشخیص، تکرار پذیری و واکنش متقاطع برای تشخیص توکسین بوتولینوم تایپ E انجام شد.

مواد و روش‌ها: در روش دابل ساندویچ الایزا به دو آنتی بادی که به اپیتوپ‌های بدون تداخل روی آنتی ژن متصل می‌شوند، نیاز است. برای این منظور، آنتی بادی خرگوشی در پایین (آنتی بادی پذیرنده، Capture antibody) و آنتی بادی موشی در بالای توکسین(آنتی بادی شناساگر، Detection antibody) درون هر چاهک ریخته شده و توکسین از چاهک اول تیتر گردید.سپس، برای تنظیم و بهینه کردن سیستم ساندویچ الایزا آزمایشات تکرار پذیری و واکنش متقاطع انجام شد.

یافته‌ها: روش دابل ساندویچ الایزا قادر به شناسایی مقدار ۱ نانوگرم توکسین بوتولینوم تیپ E می‌باشد. در این مطالعه تجربی، شایستگی داده‌های این روش بررسی شد که نتایج آن نشان داد تکرار پذیری از طریق سه بار تکرار آزمایش در یک روز و چهار بار تکرار آزمایش در روزهای مختلف، مطلوب و واکنش متقاطع آن با تیپ B و توکسین تتانوس ناچیز بود.

نتیجه‌گیری: تاکنون، روش‌های مختلفی براساس سنجش سرولوژیکی توکسین بوتولینوم ارایه شده است؛ اما در این بین روش الایزا، بهترین و کاربردی ترین روش بوده است. برای بهبود حساسیت سنجش، روش‌های تغییر یافته الایزا مطرح شده است که پیشرفته ترین آن‌ها روش دابل ساندویچ الایزا است. این روش سریع، بسیار اختصاصی و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی دارد. این روش برای تعیین آنتی ژن خاص در نمونه مجهول کاربرد دارد.

کلید واژه‌ها: کلستریدیوم بوتولینوم، دابل ساندویچ الایزا، توکسین بوتولینوم تایپ E

[1]دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

[2]استاد، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول:

محمد ابراهیم مینایی

تلفن: ۹۳۵۲۲۱۹۵۰۳(۹۸+)

پست الکترونیک:

ebimomi@gmail.com

مقدمه

توکسین بوتولینوم به عنوان قویترین توکسین معرفی شده است. این توکسین علاوه بر کاربردهای درمانی در پزشکی (بوتاکس)، به عنوان یک تهدید در جنگ بیولوژیک و بیوتروریسم محسوب می‌شود. توکسین بوتولینوم از طریق غذای آلوده و یا عفونت وارد جریان خون شده، می‌تواند سبب بروز یک بیماری فلج شل شدید

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 183-192

شود. علائم و شدت بوتولیسم در انسان بر اساس سروتیپ و مقدار توکسین خورده شده، متفاوت است. بوتولیسم معمولاً در انسان به شکل یک فلج عصبی- عضلانی متقارن فعال به سرعت تظاهر می‌کند. قطع نفس یا توقف عمل قلب و انسداد راه هوایی می‌تواند منجر به مرگ شود. درمان بوتولیسم مشکل است و به اکثر بیماران آنتی توکسین داده می‌شود. بنابراین درمان در واقع پیشگیری اولیه است و سرعت تشخیص توکسین بسیار اهمیت دارد [۳-۱].

برای شناسایی باکتری کلستریدیوم بوتولینوم آزمایش ها یی نظیر مشاهده مستقیم و بررسی میکروسکوپی نمونه، رنگ آمیزی (ساده، مرکب و اختصاصی)، کشت و بررسی کلنی‌ها، کشت در محیط های اختصاصی و افتراقی و...، نیازمندی‌های تغذیه‌ای و رشد، توانایی‌های تخمیر، منبع کربن مورد استفاده، مقاومت آنتی بیوتیکی، تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی، فاژ تایپینگ، باکتریوسین تایپینگ و... وجود دارد. همچنین امروزه از آزمایش های دقیق و حساسی نظیر روش‌های ملکولی جهت شناسایی باکتری کلستریدیوم بوتولینوم استفاده می‌شود. حساسیت این تست‌ها بسیار زیاد است اما تنها قادر به تشخیص باکتری هستند و این روش‌ها برای تشخیص توکسین باکتری کارآیی ندارند. معمولاً به دنبال شیوع بوتولیسم در غذای مشکوک و یا در مدفوع بیماران و غیره به جای جستجوی باکتری،توکسین آن جستجو می‌شود [۵ و ۴].

گرچه روش‌های مختلف آزمایشگاهی وجود دارند، اما آزمایش روی موش آزمایشگاهی (mouse bioassay) هنوز به عنوان حساسترین و کاربردی ترین روش (gold standard) استفاده می‌شود (کمتر از ۱۰ پیکوگرم در میلی لیتر) که شامل ۲ مرحله است: [۷ و ۶]

۱- نشان دادن وجود توکسین در مایعی که به موش تزریق می‌شود.

۲- تشخیص سروتیپ توکسین توسط بی اثر کردن آن با آنتی توکسین مربوطه.

استفاده از موش برای تعیین توکسین بوتولینوم روش مناسب و بسیار حساسی است اما زمان زیادی لازم دارد و همچنین مرگ غیر اختصاصی موش ممکن است نتیجه آزمایش را مختل نماید. برای برطرف کردن این مشکلات و اجتناب از به کار بردن حیوانات ، روش‌های ایمونولوژیکی ابداع شدند. مطالعات نشان دادند که بین تیپ‌های مختلف واکنش متقاطع وجود دارد [۸]. در مطالعات اولیه کمیت آنتی ژن با روش های هماگلوتیناسیون و ایمونودیفیوژن سنجیده می شد. در مطالعات بعدی روش‌ها ی اختصاصی برای شناسایی توکسین ها طراحی شد. در روش هماگلوتیناسیون تسهیل شده از آنتی سرمی که آنتی بادی ها ی ضد توکسین آن بوسیله کروماتوگرافی جدا شده باشد، استفاده می شود. در روش رادیوایمونواسی از توکسین خالص برای تهیه آنتی ژن نشاندار استفاده می‌شود. همچنین در روش های کشت نسج از سلول های حیوانی و یا انسانی (Cell line) زیادی برای تشخیص توکسین استفاده شده است [۹ و ۸].

تاکنون، روش های مختلفی براساس سنجش سرولوژیکی ارایه شده است؛ اما دراین بین روش الایزا، بیشترین کاربرد را برای آنالیز غذاها داشته است. برای بهبود حساسیت سنجش، روش های تغییر یافته الایزا مطرح شده است که پیشرفته ترین آن‌ها روش ساندویچ الایزا (Double Sandwich ELISA Assays) است. این روش سریع، بسیار اختصاصی و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی دارد. این روش برای تعیین آنتی ژن خاص در نمونه مجهول به‌کار می‌رود و اگر آنتی ژن استاندارد خالص در دسترس باشد می‌تواند مقدار مطلق آنتی ژن را در نمونه مجهول مشخص نماید [۱۲-۱۰]

در این تحقیق، با توجه به اهمیت سرعت و دقت در تشخیص توکسین بوتولینوم، ما تلاش نمودیم تا با استفاده از روش اصلاح شده Double Sandwich ELISA و به‌کار بردن دو ایمونوگلوبولین (IgG) تخلیص شده خرگوشی و موشی، توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E تا مقدار نانوگرم و در مدت زمان کوتاه، شناسایی کنیم.

مواد و روش‌ها

مواد مورد نیاز: میکرو پلیت الیزا (NUNC)، آنتی بادی ضد IgG اسبی کانژوگه به آنزیم پراکسیداز (Sigma:A 6917)، آنتی بادی ضد IgG خرگوش کانژوگه به آنزیم پراکسیداز (Dako:P 0448) و آنتی بادی ضد IgG موش کانژوگه به آنزیم پراکسیداز (Sigma:P 1526)، (Dako:P 0447)، (o-Phenylenediamine) OPD، آنتی بادی خرگوشی علیه آنتی ژن بوتولینوم تیپ E و آنتی بادی موشی علیه آنتی ژن بوتولینوم

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۲ - دوره۲ - شماره ۳- صفحات ۱۸۳-۱۹۲

تیپ E [۱۳]. تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق از انستیتو پاستور فرانسه و ایران تهیه شده است.

روش کار: این مطالعه از نوع تحقیقاتی است و از روش دابل ساندویچ الایزا برای تشخیص توکسین بوتولینوم تیپ E استفاده شد. در روش دابل ساندویچ الایزا به دو آنتی بادی که به اپیتوپ‌های بدون تداخل روی آنتی ژن متصل می‌شوند، نیاز است. برای این منظور از دو آنتی بادی منوکلونال که جایگاه‌های مجزایی را تشخیص می‌دهند و یا از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تخلیص شده استفاده می‌شود.

الف- آزمایش ساندویچ الایزا:

۱- مرحله پوشیده شدن کف میکروپلیت از آنتی بادی اولیه: مقدار مشخصی از آنتی بادی اول در کوتینگ بافر (بافر کربنات سدیم، ۰/۰۵ مولار) حل و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول در هر چاهک یک ستون میکروپلیت ریخته شد. سپس میکروپلیت به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری گردید.

۲- مرحله شستشو و خشک کردن:هر چاهک با بافر فسفات دارای توئین چندین بار شستشو می‌شود. برای خشک کردن،با میکروپلیت روی تنظیف پارچه‌ای ضربه می‌زنیم.

۳- مرحله بلوکه کردن محل ها ی خالی از آنتی بادی در کف چاهک ها:مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول بلاک کننده (بافر فسفات دارای توئین به همراه ۵ درصد پودر شیر خشک) در همه چاهک‌ها ریخته و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری گردید. عمل شستشو نیز انجام شد.

۴- تهیه سریال رقت از آنتی ژن در هر چاهک:ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBST در همه چاهک‌ها ریخته و سپس مقدار مشخصی از توکسین در ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBST حل کرده و به چاهک اول اضافه شد و در چاهک‌های بعدی سریال رقت تهیه شد. میکروپلیت را نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و عمل شستشو را انجام گردید.

۵- مرحله افزودن آنتی بادی ثانویه: مقدار مشخصی آنتی بادی در PBST حل کرده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از آن اضافه گردید سپس میکروپلیت را به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری شد.

۶- مرحله افزودن آنتی بادی‌های کانژوگه شده با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز مقدار ۱ میکرولیتر از آنتی بادی کانژوگه ثانویه را به ۲ میلی لیتر بافر PBST و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه می کنیم. میکروپلیت را نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و عمل شستشو انجام شد.

۷- مرحله افزودن سوبسترا و توقف آزمایش:مقدار ۲ میلی گرم ماده OPD را در ۵ میلی لیتر بافر فسفات حل و ۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه به آن و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه کردیم. با تغییر رنگ، واکنش را با اسید سولفوریک متوقف شده و نتایج توسط دستگاه خوانده می‌شود [۱۶-۱۴].

برای انجام این آزمایش، از آنتی‌بادی تخلیص شده از سرم خرگوش و موش ایمن شده نسبت به توکسین، استفاده گردید (مینایی، ۱۳۸۹) [۱۳]. آزمایشات زیر برای تنظیم و بهینه کردن سیستم ساندویچ الایزا انجام می‌شود:

ب) تعیین حداقل مقدار آنتی ژن و آنتی بادی‌ها: در مرحله اول مقدار آنتی ژن ثابت (۳۵ نانوگرم در هر چاهک) و مقدار آنتی بادی ها (از ۱۰ میکروگرم) تیتر شد. در مرحله دوم مقدار آنتی بادی‌ها ثابت (۲/۵ میکروگرم در هر چاهک) و مقدار آنتی ژن (از ۳۵ نانوگرم) تیتر شد. آنتی‌بادی خرگوشی (Capture antibody) در پایین و آنتی بادی موشی (Detection antibody) در بالای توکسین قرار می گیرد. مقدار بهینه آنتی بادی که بتواند کمترین مقدار آنتی ژن را شناسایی نماید، مد نظر می‌باشد.

لازم به ذکر است که در چاهک‌های کنترل یک ردیف به ترتیب آنتی بادی خرگوشی + آنتی بادی موشی + آنتی بادی موشی کونژوگه، آنتی بادی خرگوشی + آنتی بادی موشی کونژوگه، آنتی بادی خرگوشی + توکسین + آنتی بادی موشی کونژوگه، آنتی بادی موشی + توکسین + آنتی بادی موشی کونژوگه، توکسین + آنتی بادی موشی کونژوگه، آنتی بادی موشی + آنتی بادی موشی کونژوگه و آنتی بادی موشی کونژوگه ریخته می‌شود.

ج) تکرار پذیری آزمایش: بعد از این که مقدار آنتی بادی ها برای شناسایی حداقل مقدار آنتی ژن بهینه شد، این آزمایش ۴ بار متوالی در چهار روز مختلف و سپس ۳ بار متوالی در یک روز انجام شد.

د) واکنش متقاطع: سیستم ساندویچ الایزای غیر مستقیم که در آزمایشات فوق قادر به شناسایی توکسین بوتولینوم تیپ E بود، به

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 183-192

منظور مشخص شدن میزان واکنش متقاطع با توکسین بوتولینوم تیپ B و توکسین تتانوس، به طور همزمان با شرایط یکسان انجام شد.

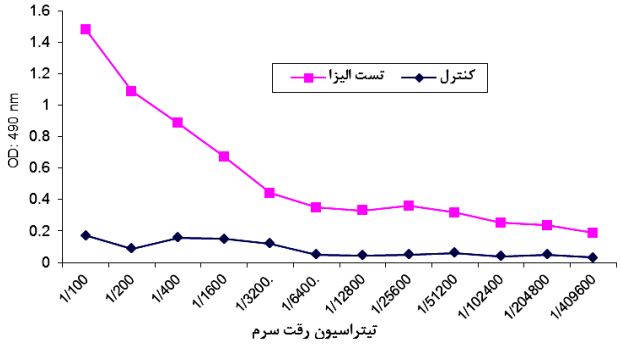
یافته‌ها

الف) تعیین حداقل مقدار آنتی ژن و آنتی بادی ها: با انجام این آزمایش مشخص شد که باید غلظت آنتی بادی برای شناسایی توکسین بالاتر از ۰/۶۲۵ میکروگرم باشد و هر چه غلظت آنتی‌بادی افزایش می‌یابد، OD نیز زیاد می‌شود. در نتیجه غلظت‌های ۱/۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکروگرم آنتی بادی می تواند مناسب باشد.البته در صورتی که مقدار آنتی‌بادی موشی و خرگوشی در هر چاهک زیاد باشد، چاهک مربوط به کنترل IgGR+IgGM+MConj خیلی سریع رنگی می‌شود و باید واکنش را متوقف نمود. این موضوع به ویژه هنگام مقایسه دو توکسین مختلف اشکال ایجاد می‌کند. به این جهت، مقدار آنتی بادی موشی و خرگوشی در هر چاهک ۲/۵ میکروگرم انتخاب شد تا فرصت بیشتری برای انجام واکنش رنگی بوجود آید.

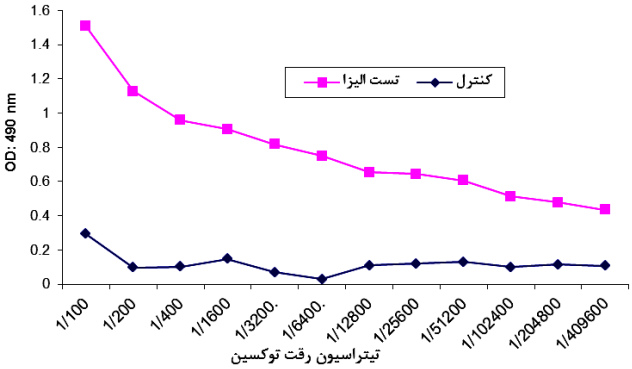
در این آزمایش (نمودار ۱) مشاهده شد که با افزایش مقدار آنتی بادی، میزان OD به حد مطلوبی افزایش می یابد و مقدار توکسین تا حدود ۱ نانوگرم را شناسایی شد. این آزمایش به همین روش چندین بار تکرار شد که یکی از نتایج آن به صورت زیر (نمودار ۲) می‌باشد.

ب) تکرار پذیری آزمایش:فاصله اطمینان ۴ آزمایش متوالی ساندویچ الایزا در چهار روز مختلف و سپس ۳ آزمایش متوالی ساندویچ الایزا در یک روز با ضریب اطمینان ۹۵ درصدتوسط نرم افزار SPSS محاسبه شد و نتایج آن به صورت زیر است (نمودار ۳ و ۴).

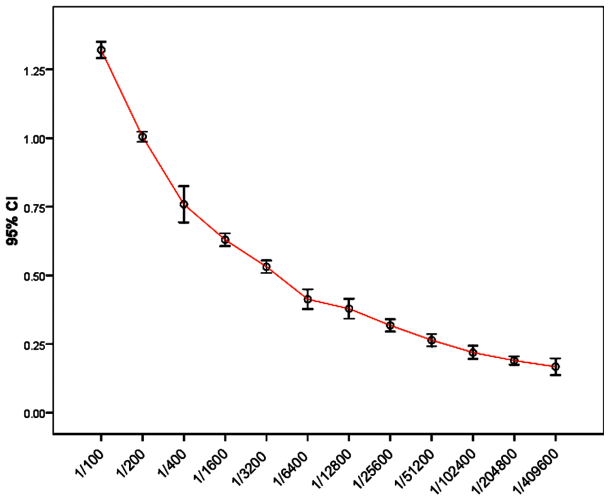
ج) واکنش متقاطع: از روش ساندویچ الایزای غیر مستقیم که در آزمایشات فوق قادر به شناسایی توکسین بوتولینوم تیپ E بود، به منظور بررسی واکنش متقاطع با توکسین بوتولینوم تیپ B و توکسین تتانوس، استفاده شد. این آزمایش به طور همزمان و با شرایط یکسان برای توکسین بوتولینوم تیپ B و توکسین تتانوس انجام شد. این روش قادر به شناسایی توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E تا مقدار ۱ نانوگرم می‌باشد و واکنش متقاطع آن با تیپ B و توکسین تتانوس ناچیز است. آزمایش فوق چندین بار تکرار گردید (نمودار ۵ و ۶).



نمودار ۱: نمودار ساندویچ الایزا- کف هر چاهک با مقدار ۲/۵ میکروگرم آنتی بادی خرگوشی پوشانده و روی آن در هر چاهک مقدار ۳۵ نانوگرم توکسین ریخته شد. سپس از چاهک اول مقدار ۱۰ میکروگرم آنتی بادی موشی تیتر شد. مشاهده شد که غلظت آنتی‌بادی برای شناسایی توکسین بالاتر از ۰/۶۲۵میکروگرم (از رقت ۱/۶۴۰۰به بالا) مناسب است.

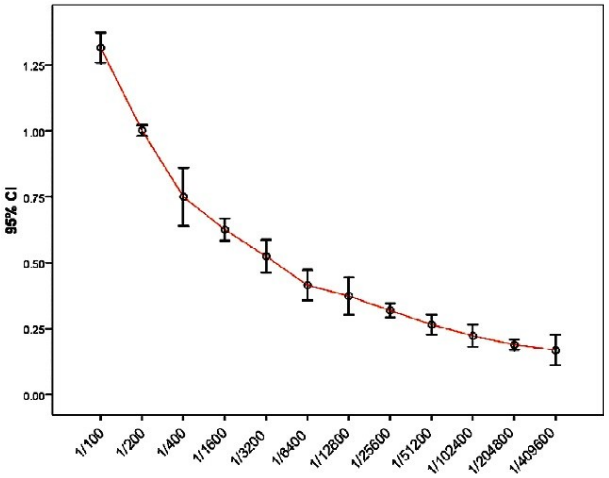


نمودار ۲: نمودار ساندویچ الایزا- کف هر چاهک با مقدار ۲/۵ میکروگرم آنتی بادی خرگوشی پوشانده و روی آن مقدار ۳۵ نانوگرم توکسین از چاهک اول تیتر شد. سپس در هر چاهک مقدار ۲/۵ میکروگرم آنتی‌بادی موشی ریخته شد. توکسین در حد ۱ نانوگرم (از رقت ۱/۶۴۰۰ به بالا) قابل شناسایی است.

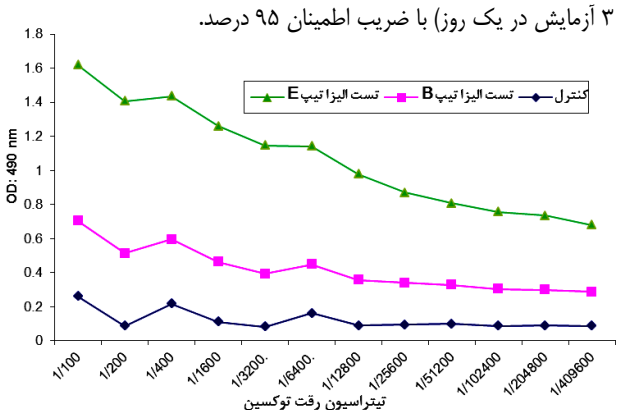


نمودار ۳: فاصله اطمینان چهار آزمایش ساندویچ الایزا فوق با ضریب اطمینان ۹۵ درصد.

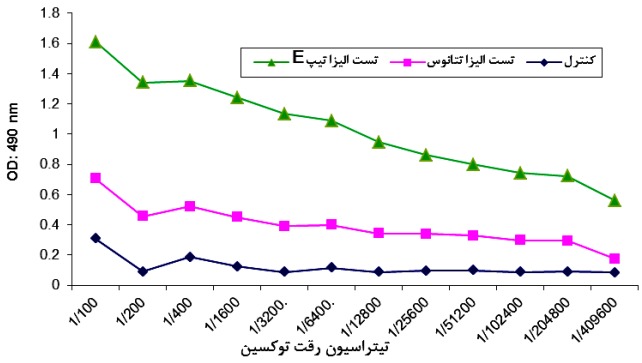
مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۲ – دوره۲ – شماره ۳– صفحات ۱۸۳–۱۹۲



نمودار ۴: فاصله اطمینان سه آزمایش ساندویچ الایزا فوق (تکرار مکرر ۳ آزمایش در یک روز) با ضریب اطمینان ۹۵ درصد.



نمودار ۵: نمودار ساندویچ الایزا اول– به طور همزمان توکسین بوتولینوم تیپ E و B در دو ستون یک میکروپلیت به مقدار مساوی ۳۵ نانوگرم از چاهک اول تیتر شد. آنتی بادی پایینی خرگوشی و بالایی موشی علیه تیپ Eبه مقدار ۵/۲ میکروگرم در هر چاهک بود. توکسین بوتولینوم تیپ E در حد ۱ نانوگرم (از رقت ۱/۶۴۰۰ به بالا) قابل شناسایی است و واکنش متقاطع آن با تیپ B بسیار کم است.



نمودار ۶: نمودار ساندویچ الایزا اول– به طور همزمان توکسین بوتولینوم تیپ E و تتانوس در دو ستون یک میکروپلیت به مقدار مساوی ۳۵ نانوگرم از چاهک اول تیتر شد. آنتی بادی پایینی خرگوشی و بالایی موشی علیه تیپ E به مقدار ۲/۵ میکروگرم در هر چاهک بود. توکسین بوتولینوم تیپ E در حد ۱ نانوگرم قابل شناسایی است و واکنش متقاطع آن با توکسین تتانوس بسیار کم است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق ما با استفاده از آزمایش دابل ساندویچ الایزا، به روشی دست یافتیم که مقدار حدود ۱ نانوگرم توکسین بوتولینوم تیپ E را در مدت کمتر از ۶ ساعت شناسایی می‌کند،در حالی که تکرار پذیری این روش با سه بار تکرار آزمایش در یک روز و چهار بار تکرار آزمایش در روزهای مختلف، مطلوب بود و واکنش متقاطع آن با توکسین بوتولینوم تیپ B و توکسین تتانوس ناچیزاست.

از آنجا که مقدار بسیار ناچیز توکسین بوتولینوم موجب مرگ افراد می‌شود (دز کشنده آن تقریباً ۱ نانوگرم برای هر کیلوگرم وزن بدن انسان می‌باشد) و از طرف دیگر، دارویی برای مسمومین غیر از آنتی توکسین آن وجود ندارد، لذا روش تشخیصی که بتواند مقدار بسیار اندک توکسین بوتولینوم را در زمان کوتاه شناسایی نماید، بسیار اهمیت دارد [۱۸ و ۱۷]. برای شناسایی و تشخیص توکسین بوتولینوم، هنوز آزمایش روی موش آزمایشگاهی (مقدار ۱۰ پیکوگرم توکسین در هر میلی لیتر را شناسایی می‌کند) در شرایط in vivo برای شناسایی توکسین‌های بوتولینوم، حساسترین و بهترین روش[۱] است [۲۰]. ولی به دلیل مشکلات کار با حیوان آزمایشگاهی، مدیریت دارو و غذا (FDA) و مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) تلاش جمعی برای توسعه روش‌های شناسایی توکسین بوتولینوم در شرایط in vitro را انجام می‌دهند [۲۱].

برای تشخیص باکتری کلستریدیوم بوتولینوم از تست‌های حساسی نظیر PCR و DNA-probe می‌توان استفاده نمود. این روش‌ها حساسیت بسیار زیادی دارند اما برای تشخیص توکسین باکتری کارآیی ندارند. برای شناسایی توکسین های بوتولینوم تست های ایمونولوژیک متعددی نیز ارائه شده اند که در مقایسه با آزمایش روی موش (mouse bioassay) حساسیت کمتری دارند [۱۹، ۵ ، ۴]. تاکنون، روشهای مختلفی بر اساس سنجش سرولوژیکی ارائه شده است اما در این بین روش ELISA بیشترین کاربرد را برای آنالیز غذاها داشته است [۲۴–۲۲]. برای بهبود حساسیت سنجش، روش‌های تغییر یافته ELISA مطرح شده است که پیشرفته ترین آنها روش ساندویچ الایزا Digoxigenin-Enzyme Linked Immunosorbent Assay(DIG-ELISA) می باشد. این روش سریع، بسیار اختصاصی و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 183-192

دارد. برای انجام این آزمایش به دو آنتی بادی که به اپیتوپ‌های بدون تداخل روی آنتی ژن متصل می‌شوند، نیاز است [۲۹-۲۵].

تکنیک الایزا توسط انگوال و پرلمن[2] در سال ۱۹۷۱ توصیف شده است که بعداً تغییراتی در این روش داده شد [۳۰]. در سال ۱۹۷۹، اولین آزمایش برای تعیین توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تخلیص شده با روش الایزا و آزمایش روی موش، توسط نوترمنز[3] انجام شد. در این تجربه نشان داده شد که تکنیک الایزا می‌تواند برای تعیین توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E مناسب باشد. در سال ۱۹۸۲ آزمایش الایزا، که در کف میکروپلیت توکسوئید تیپ‌های A، B و E به عنوان آنتی ژن ثابت شده بودند، توانست آنتی بادی‌های علیه توکسین بوتولینوم در سرم دو بیمار مبتلا به بوتولیسم نوزادان را نشان دهد. همچنین روش دابل ساندویچ الایزا برای تحقیق پاسخ سیستم ایمنی به توکسوئید بوتولینوم استفاده شده است [۳۱]. در سال ۱۹۸۴، تحقیقی برای تعیین حداقل مقدار توکسین مشخص شده به‌وسیله روش الایزا و آزمایش روی موش توسط دزفولیان انجام شد که حداقل مقدار آنتی ژن تعیین شده بوسیله روش دابل ساندویچ الایزا برابر دز کشنده ۵۰ درصد حدود ۱۰ موش محاسبه شد [۳۲]. روش استاندارد برای تعیین آنتی بادی علیه توکسین بوتولینوم، آزمایش روی موش است. اندازه‌گیری آنتی بادی‌های اختصاصی علیه نوروتوکسین کلستریدیوم بوتولینوم توسط سنجش in vivo انجام می‌شود که در آن توکسین کشنده قبل از تزریق به موش خنثی سازی می‌شود. در گزارشات مختلفی ذکر شده که تکنیک الایزا با میکروپلیت‌های پوشیده شده از نوروتوکسین و دومین آنتی بادی‌های نشان‌دار شده می‌تواند نتایج قابل مقایسه‌ای با روش آزمایش روی موش داشته باشد. در سال ۱۹۹۴، دولگاست[4] و همکارانش چندین راهکار ایمونواسی برای اندازه گیری نوروتوکسین و آنتی توکسین تیپ A، B و E مطرح کردند. در یکی از این راهکارها، آنتی بادی مرغ و آنتی‌بادی‌های نشاندار شده‌ی RVV-XA به همراه نوروتوکسین انکوبه می‌شود. این کمپلکس به یک پلیت حاوی ایمونوگلوبولین G مرغ (IgG) باند می شود. از این روش برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی اختصاصی نیز استفاده می‌شود [۳۳-۳۵].

در این تحقیق، ما از روش ساندویچ الایزای اصلاح شده جهت شناسایی توکسین استفاده نمودیم. آنتی توکسین تخلیص شده خرگوشی در کف میکروپلیت پوشانده شد که موجب گیر انداختن توکسین می شود. آنتی توکسین تخلیص شده موشی در بالای توکسین قرار می‌گیرد که موجب شناسایی توکسین می‌شود. با توجه به بهینه کردن آزمایش ساندویچ الایزا، ما توانستیم توکسین تا مقدار ۱ نانوگرم را در مدت کمتر از ۶ ساعت شناسایی نماییم. این روش جهت شناسایی سریع توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E و انجام اقدامات درمانی مناسب کاربرد دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری و راهنمایی های تمام اعضاء گروه و مرکز تحقیقات‌زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین(ع) که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA 2001; 285: 1059-70.
2. Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. Microbiol rev 1992; 56: 80-99.
3. Thajeb T, Chen YM, Dai DF, Thajeb DD, Thajeb P. Botulism: A frequently forgotten old malady. Inter J Geronto 2007; 1: 118-24.
4. Phillips RW, Abbott D. High-throughput Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay(ELISA) electro-chemiluminescent detection of botulinum toxins in foods for food safety and defense purposes. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control 2008; 25: 1084-8.
5. Austin JW, Sanders G. Detection of Clostridium botulinumand its toxins in suspect foods and clinical specimens. Ottawa: Food Directorate Publication. 2009.
6. Betley MJ, Sugiyama H. Noncorrelation between mouse toxicity and serologically assayed toxin in clostridium botulinum type A culture fluids. Appl Environ Microbiol 1979; 38: 297-300.
7. Grate JW, Ozanich RM, Warner MG, Bruckner-Lea CJ, Marks JD. Advances in assays and analytical approaches for Botulinum Toxin Detection. Trends in Anal Chem TrAC 2010; 29: 1137-56.
8. Szilagyi M, Rivera VR, Neal DM, Gerald A, Poli MA. Development of sensitive colorimetric captureelisas for Clostridium botulinum neurotoxin serotypes A and B. Toxicon 2000; 38: 381-9.
9. Capek P, Dickerson TJ. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin

[1]: Gold Standard, [2]: Engvall&Perlmann, [3]: S. Notermans, [4]: Gorge J. Doellgast

Detection. Toxins 2010; 2: 24-53.
10.Cai S, Singh BR, Sharma S. Botulism diagnostics: From clinical symptoms to in vitro assays. Crit Rev Microbiol 2007; 33: 109–25.
11.Lindstrom M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 298–314.
12.Sharma SK, Whiting RC. Methods for detection of Clostridium botulinum toxin in foods. J Food Prot 2005; 68: 1256–63.
13.Minaei ME, Sa'adati M. Production of Clostridium botulinum Type E Antitoxin. MilMed Journal 2010; 12: 51-6. (Persian)
14.Notermans S, Dufrenne J, Kozaki S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum type E toxin. Appl Environ Microbiol 1979; 37: 1173–5.
15.Volland H, Lamourette P, Nevers MC, Mazuet C, Ezan E, Neuburger LM, et al. A sensitive sandwich enzyme immunoassay for free or complexedClostridium botulinum neurotoxin type A. J Immunol Methods 2008; 330: 120–9.
16.Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC. Detection of Type A, B, E, and F Clostridium botulinum Neurotoxins in Foods by Using an Amplified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Digoxigenin-Labeled Antibodies. Appl Environ Microbiol 2006; 72: 1231–38.
17.Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbialneurotoxins in medicine. Microbiol Rev 1992; 56: 80–99.
18.Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulism: Cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. Disaster Med. Public Health Prep 2007; 1: 122–34.
19.Keller JE. Characterization of new formalin-detoxified botulinum neurotoxin toxoids. Clin Vaccine Immunol 2008; 15: 1374-9.
20.Hielm S, Hyytig E, Ridell J, Korkeala H. Detection of Clostridium botulinurn in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. Inter J Food Microbiol 1996; 31: 357-65.
21.Shone C, Ferreir J, Boyer A, Cirino N, Egan C, Evans E, et al. Aspects of Botulinum and Tetanus Neurotoxins. Workshop Rev: Assays and Detection, The 5th International Conference on Basic and Therapeutic, Neurotoxicity Research 2006; 9: 205-16.
22.Doellgast, GJ, TriscottMX, Beard GA, Bottoms JD, Cheng T, Roh BH, et al. Sensitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. J Clin Microbiol 1993; 31:2402–9.
23.Wictome M, Newton K, James K, Hallis BD, Mackay E, Clarke S, et al. Development of an in vitro bioassay Clostridium botulinum type B Neurotoxin in foods that is move sensitive than the mouse bioassay. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3787–92.
24.Kimura B, Kawasaki S, Nakano H, Fujii T. Rapid, quantitative PCR monitoring of growth of Clostridium botulinum type E in modified atmosphere-packaged fish. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 206–16.
25.Ferreira JL,Eliasberg SJ, Harrison MA, Edmonds P. Detection of preformed type Abotulinal toxin in hash brown potatoes by using the mouse bioasssay and a modified ELISA test. J. AOAC Int. 2001;84: 1460–4.
26.Ferreira JL, Maslanka S, Johnson E, Goodnough M. Detection of botulinal neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: Collaborative study. J AOAC Int 2003; 86: 314–31.
27.Ferreira JL,Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type Abotulinal toxin in food. J Food Prot 2004; 67: 203–6.
28.Depamede SN, Kisworo D. Development of enzyme-linkage immunosorbent assay against type B of Clostridium botulinum: A preliminary study. J Indonesian Trop Anim Agric 2011; 36: 237-42.
29.Sachdeva A, Defibaugh-Cha´vez Stephanie LH, Day JB, Zink D, Sharma SK. Detection and Confirmation of Clostridium botulinum in Water Used for Cooling at a Plant Producing Low-Acid Canned Foods. Appl Environ Microbiol 2010; 76: 7653–7.
30.Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8: 871–4.
31.Notermans S, Dufrenne J, Kozaki S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum type E toxin. Appl Environ Microbiol 1979; 37: 1173–5
32.Dezfulian M, Bartlett JG. Detection of Clostridium botulinum type A toxin by enzyme-linked immunosorbent assay with antibodies produced in immunologically tolerant animals. J Clin Microbiol 1984; 19: 645–8.
33.Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, Bottoms JD. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Enzyme-Linked Coagulation Assay for detection of antibodies to Clostridium botulinum neurotoxins A,B, and E and solution-phase complexes. J Clin Microbiol 1994; 32: 851–3.

Journal of Police Medicine
Fall 2013; Vol. 2, No. 3: 183-192

34.Rubin LG, Dezfulian M, Yolken RH. Serum antibody response to Clostridium botulinum toxin in infant botulism. J Clin Microbiol 1982; 16: 770 -1.
35.Baldwin MR, Tepp WH, Pier CL, Bradshaw M, Ho M, Wilson BA, et al. Characterization of the antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. Infect Immun 2005; 73: 6998–7005.

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۲ – دوره۲ – شماره ۳- صفحات ۱۸۳-۱۹۲