Original Article

روش تغییریافته Double Sandwich ELISA برای تشخیص توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E

محمد ابراهیم مینایی*، مجتبی سعادتی

گروه زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۲/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: مقدار بسیار ناچیز توکسین *بوتولینوم* موجب مرگ افراد می‌شود و از طرف دیگر، درمانی برای مسمومین غیر از آنتیتوکسین آن وجود ندارد. لذا روش تشخیصی که بتواند مقدار بسیار اندک توکسین *بوتولینوم* را در زمان کوتاه شناسایی نماید، بسیار اهمیت دارد. این مطالعه با هدف تشخیص سریع و دقیق توکسین بوتولینوم تیپ E بوسیله روش تغییریافته دابل ساندویچ الایزا[1] انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در روش دابل ساندویچ الایزا به دو آنتی‌بادی که به اپیتوپ‌های بدون تداخل روی آنتی‌ژن متصل می‌شوند، نیاز است. برای این منظور، آنتی‌بادی خرگوشی در پایین (Capture antibody) و آنتی‌بادی موشی در بالای توکسین (Detection antibody) درون هر چاهک ریخته شد و توکسین از چاهک اول تیتر گردید. سپس، سیستم ساندویچ الایزای تغییریافته برای تشخیص توکسین *بوتولینوم* تیپ E تنظیم و بهینه‌سازی شد.

نتایج: روش تغییریافته دابل ساندویچ الایزا، توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E تا مقدار ۱ نانوگرم در مدت زمان کمتر از ۶ ساعت را تشخیص داد.

نتیجه‌گیری: روش تغییریافته دابل ساندویچ الایزا، برای تشخیص توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E بسیار دقیق بوده و سریع انجام می‌پذیرد. این روش برای تعیین آنتی‌ژن خاص در نمونه مجهول کاربرد دارد.

کلمات کلیدی: ***کلستریدیوم بوتولینوم*، توکسین *بوتولینوم* تیپ E، آنتی بادی، دابل ساندویچ الایزا.**

مقدمه

بیماری بوتولیسم، توسط باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* که جزء باسیل‌های گرم مثبت، بی هوازی، متحرک و اسپوردار هستند، در سال ۱۸۹۷ توسط فون ارمنگم (Van Ermengem) تشخیص داده شد. باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* بر اساس خصوصیات توکسینی که تولید می‌کند، دارای ۷ تیپ (A تا G) است(۱). توکسین *بوتولینوم* به عنوان قوی‌ترین توکسین معرفی شده است. این توکسین علاوه بر کاربردهای درمانی در پزشکی نظیر درمان لوچی، اسپاسم، بلفارواسپاسم و بهره‌های آرایشی (بوتاکس)، به عنوان یک تهدید در جنگ بیولوژیک و بیوتروریسم نیز محسوب می‌شود. توکسین *بوتولینوم* از طریق غذای آلوده و یا عفونت وارد جریان خون شده، می‌تواند سبب بروز یک بیماری فلج شل شدید 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. بیماران مبتلا به بوتولیسم در طی مسمومیت از نظر عقلی و هوشی (مگر در مراحل آنوکسی) هوشیارند. 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 (۴-۲).

برای تشخیص باکتری کلستریدیوم بوتولینوم، آزمایش‌هایی نظیر مشاهده مستقیم و بررسی میکروسکوپی نمونه، رنگ‌آمیزی (ساده، مرکب و اختصاصی)، کشت و بررسی کلنی‌ها، کشت در محیط‌های اختصاصی و افتراقی و غیره، نیازمندی‌های تغذیه‌ای و رشد، توانایی‌های تخمیر، منبع کربن مورد استفاده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تزریق به حیوان حساس آزمایشگاهی، فاژ تایپینگ، باکتریوسین تایپینگ و غیره وجود دارد. همچنین امروزه از آزمایش‌های دقیق و حساسی نظیر روش‌های ملکولی جهت تشخیص باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* استفاده می‌شود. حساسیت این تست‌ها می‌تواند بسیار بالا باشد، اما تنها قادر به تشخیص باکتری هستند و 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 (۶، ۵).

گرچه روش‌های مختلف آزمایشگاهی وجود دارند، اما آزمایش روی موش آزمایشگاهی (mouse bioassay) هنوز به عنوان حساس‌ترین و کاربردی‌ترین روش (gold standard) استفاده می‌شود (کمتر از ۱۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر). این آزمایش‌ها از طریق نشان دادن وجود توکسین در مایعی که به موش تزریق می‌شود و همچنین تشخیص سروتیپ توکسین توسط بی اثر کردن آن با آنتی‌توکسین مربوطه، انجام می‌شود (۸، ۷). استفاده

1- Double sandwich ELISA Assays

* **نویسنده مسئول: محمد ابراهیم مینایی**، گروه زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۳۵۲۲۱۹۵۰۳
Email: ebimomi@gmail.com

از موش برای تعیین توکسین *بوتولینوم* روش مناسب و بسیار حساسی است اما زمان زیادی لازم دارد و همچنین مرگ غیراختصاصی 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 (۹). در مطالعات اولیه کمیت آنتی‌ژن با روش‌های هماگلوتیناسیون و ایمونودیفیوژن سنجیده می‌شد. در مطالعات بعدی، روش‌های اختصاصی برای تشخیص توکسین‌ها طراحی شد. در روش هماگلوتیناسیون تسهیل شده از آنتی‌سرمی که آنتی‌بادی‌های ضد توکسین آن بوسیله کروماتوگرافی جدا شده باشد، استفاده می‌شود. در روش رادیوایمونواسی، از توکسین خالص برای تهیه آنتی‌ژن نشاندار استفاده می‌شود. همچنین در روش‌های کشت نسج از سلول‌های حیوانی و یا انسانی (Cell line) زیادی برای تشخیص توکسین استفاده شده است (۱۰، ۹).

تاکنون، روش‌های مختلفی براساس سنجش سرولوژیکی ارایه شده است؛ در این بین روش الایزا بیشترین کاربرد را برای آنالیز غذاها داشته است. برای بهبود حساسیت سنجش، روش‌های تغییریافته الایزا مطرح شده است که پیشرفته‌ترین 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 آنتی‌ژن خاص در نمونه مجهول بکار می‌رود و اگر آنتی‌ژن استاندارد خالص در دسترس باشد می‌تواند مقدار مطلق آنتی‌ژن را در نمونه مجهول مشخص نماید (۱۳-۱۱).

در این تحقیق، با توجه به اهمیت سرعت و دقت در تشخیص توکسین بوتولینوم، ما با استفاده از روش تغییریافته Double Sandwich ELISA و بکار بردن دو ایمونوگلوبولین (IgG) تخلیص شده خرگوشی و موشی، جهت تشخیص توکسین بوتولینوم تیپ E تا مقدار نانوگرم و در مدت زمان کوتاه، تلاش نمودیم. تنظیم (set up کردن) و بهینه سازی روش دابل ساندویچ الایزا جهت تشخیص توکسین بوتولینوم تیپ E هدف این تحقیق بود.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع تجربی است و در آن از روش دابل ساندویچ الایزا برای تشخیص توکسین بوتولینوم تیپ E استفاده شد. در روش دابل ساندویچ الایزا به دو آنتی‌بادی که به اپی‌توپ‌های بدون تداخل روی آنتی‌ژن متصل می‌شوند، نیاز است. برای این منظور از دو آنتی‌بادی منوکلونال که جایگاه‌های مجزایی را تشخیص می‌دهند و یا از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تخلیص شده استفاده می‌کنند.

الف- آزمایش دابل ساندویچ الایزا:

۱- مرحله پوشیده شدن کف میکرو پلیت الایزا (NUNC) از آنتی‌بادی اولیه: مقدار مشخصی از آنتی‌بادی اول در کوتینگ بافر (بافر کربنات سدیم، ۰/۰۵ مولار) حل شد. 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 داده شد. برای خشک کردن، با کمک میکروپلیت بر روی تنظیف پارچه‌ای ضربه زده شد.

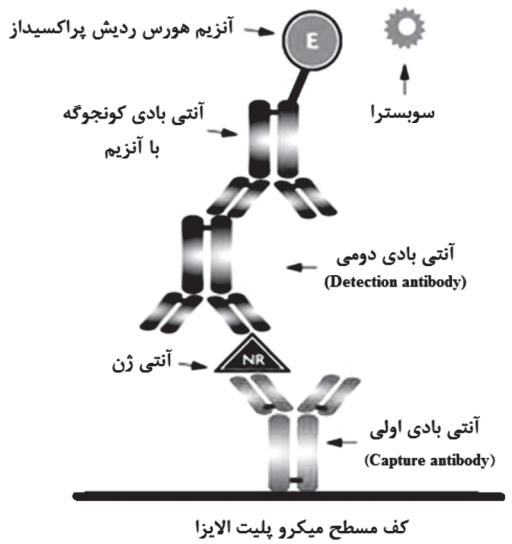
۳- مرحله بلوکه‌کردن محل‌های خالی از آنتی‌بادی در کف چاهک‌ها: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول بلاک کننده (بافر فسفات دارای توئین به همراه ۵ درصد پودر شیر خشک)، در همه چاهک‌ها ریخته شد و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری گردید. به دنبال آن، عمل شستشو نیز انجام شد.

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

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

۶- مرحله افزودن آنتی‌بادی‌های کانژوگه شده با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز: مقدار ۱ میکرولیتر از آنتی‌بادی کانژوگه ثانویه را به ۲ میلی‌لیتر بافر PBST اضافه شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. میکروپلیت، نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و عمل شستشو انجام شد.

۷- مرحله افزودن سوبسترا و توقف آزمایش: مقدار ۲ میلی‌گرم ماده OPD (o-Phenylenediamine) (Sigma:P 1526) را در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات حل و ۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه اضافه کرده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. با تغییر رنگ واکنش را با اسید سولفوریک متوقف و نتایج توسط دستگاه خوانده می‌شود (۱۶-۱۴). شمایی از روش دابل ساندویچ الایزا در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱ شمایی از روش دابل ساندویچ الایزا: آنتی ژن دربین دو آنتی بادی قرار می‌گیرد. آنتی بادی اول روی سطح متصل می‌شود و آنتی ژن را به دام می‌اندازد و آنتی بادی دوم، آنتی‌ژن به دام افتاده را شناسایی می‌کند.

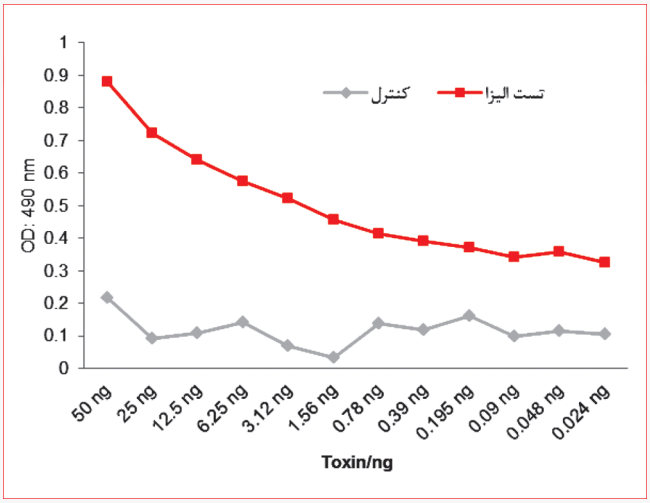
ب) آزمایش‌های مقدماتی: برای انجام این آزمایش، از آنتی‌بادی تخلیص شده از سرم خرگوش و موش ایمن شده نسبت به توکسین،

استفاده گردید(۱۷). ابتدا چند آزمایش اولیه برای تعیین آنتی‌بادی اولی (Capture antibody) و آنتی‌بادی دومی بالای توکسین (Detection antibody) انجام شد. برای این منظور، آنتی‌بادی خرگوشی به مقدار ۱/۵ میکروگرم در پایین (Capture antibody) و آنتی‌بادی موشی به همان مقدار در بالای توکسین (Detection antibody) درون هر چاهک ریخته شد و توکسین به مقدار ۵۰ نانوگرم از چاهک اول تیتر گردید. یک‌بار دیگر این آزمایش تکرار و این بار آنتی‌بادی موشی در پایین و آنتی‌بادی خرگوشی در بالای توکسین قرار داده شد.

ج) تعیین حداقل مقدار آنتی‌بادی و آنتی‌ژن: در مرحله اول، مقدار آنتی‌ژن ثابت (۳۵ نانوگرم در هر چاهک) و مقدار آنتی‌بادی‌ها (از ۱۰ میکروگرم) تیتر شد. در مرحله دوم، مقدار آنتی‌بادی‌ها ثابت (۲/۵ میکروگرم در هر چاهک) و مقدار آنتی‌ژن (از ۳۵ نانوگرم) تیتر شد. مقدار بهینه آنتی‌بادی که بتواند کمترین مقدار آنتی‌ژن را شناسایی نماید، مدنظر می‌باشد (۱۶-۱۴).

نتایج

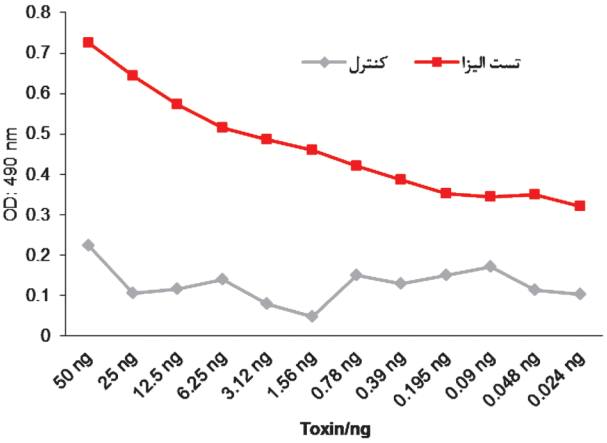
الف) آزمایش‌های مقدماتی: در آزمایش‌های اولیه با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که بهتر است آنتی‌بادی خرگوشی (Capture antibody) در پایین و آنتی‌بادی موشی (Detection antibody) در بالای توکسین قرار گیرد. در هر دو حالت، آنتی‌ژن تشخیص داده می‌شود (نمودار ۱ و ۲). در آزمایش الایزا، نسبت به کنترل، تست الایزا سنجیده می‌شود و تا ۲ برابر OD کنترل، جواب مثبت در نظر گرفته می‌شود. بنابراین، به صورت کمی نیز مقدار آنتی‌ژن شناسایی می‌شوند، ولی از آنجا که میزان OD در نمودار ۱ بیشتر از نمودار ۲ است، در نتیجه در آزمایش‌های بعدی، آنتی‌بادی خرگوشی در پایین و آنتی‌بادی موشی در بالای توکسین قرار گرفتند.



نمودار ۱ نمودار ساندویچ الیزا- کف هر چاهک با مقدار ۱/۵ میکروگرم آنتی‌بادی خرگوشی پوشانده و روی آن مقدار ۵۰ نانوگرم توکسین از چاهک اول تیتر شد. سپس در هر چاهک مقدار ۱/۵ میکروگرم آنتی‌بادی موشی ریخته شد.

چاهک	A	B	C	D	E	F
کنترل	IgGR+MConj	IgGR+Tox+MConj	Tox+IgGR+MConj	Tox+MConj	IgGM+MConj	MConj

IgGR: آنتی‌بادی خرگوشی، IgGM: آنتی‌بادی موشی، Tox: توکسین، MConj: آنتی‌بادی موشی کانجوگه.



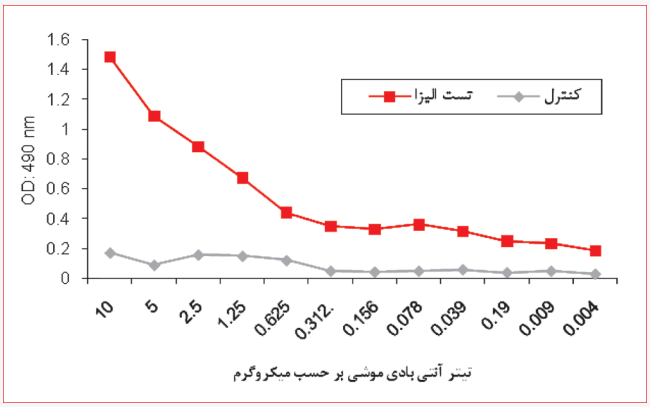
نمودار ۲ نمودار ساندویچ الیزا- کف هر چاهک با مقدار ۱/۵ میکروگرم آنتی‌بادی موشی پوشانده و روی آن مقدار ۵۰ نانوگرم توکسین از چاهک اول تیتر شد. سپس در هر چاهک مقدار ۱/۵ میکروگرم آنتی‌بادی خرگوشی ریخته شد.

ب) تعیین حداقل مقدار آنتی‌بادی و آنتی‌ژن‌ها: در این آزمایش، ابتدا مقدار آنتی‌ژن ثابت و مقدار آنتی‌بادی‌ها (از ۱۰ میکروگرم تیتر شد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که باید غلظت آنتی‌بادی برای تشخیص 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 آنتی‌بادی می‌تواند مناسب باشند. در این آزمایش (نمودار ۳) مشاهده شد که با افزایش مقدار آنتی‌بادی، میزان OD به حد مطلوبی افزایش می‌یابد. 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 آنتی‌بادی موشی و خرگوشی در هر چاهک ۲/۵ میکروگرم انتخاب شد تا فرصت بیشتری برای انجام واکنش رنگی بوجود آید.

پس از تعیین مقدار بهینه آنتی‌بادی‌ها (۲/۵ میکروگرم)، در مرحله بعدی، مقدار آنتی‌بادی‌ها ثابت (آنتی بادی خرگوشی در پایین و آنتی‌بادی موشی در بالای توکسین قرار گرفت) و مقدار آنتی‌ژن مورد بررسی قرار گرفت. آنتی ژن از مقدار ۳۵ نانوگرم تیتر و نتایج نسبت به OD کنترل سنجیده شد. به طور کمی، تیتر بالاتر از ۲ برابر حداکثر OD کنترل، مثبت می‌باشد و در این آزمایش، مقدار توکسین تا حدود ۱ نانوگرم شناسایی شد (نمودار ۴).

کارآیی ندارند. همچنین تســت‌های ایمونولـوژیک متعــددی نیز ارائه شــده‌اند که در مقایسه با تســت‌های فوق و آزمــایــش روی موش (mouse bioassay) حساسیت کمتری دارند (۱۸، ۶، ۵).

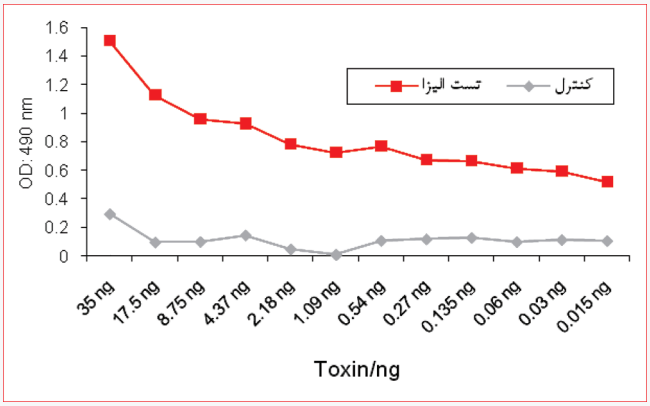
برای شناسایی و تشخیص توکسین *بوتولینوم*، آزمایش روی موش آزمایشگاهی (مقدار ۱۰ پیکوگرم توکسین در هر میلی‌لیتر را شناسایی می کند) در شرایط in vivo، حساسترین و بهترین[1] روش است (۱۹). به دلیل مشکلات کار با حیوان آزمایشگاهی، مدیریت دارو و غذا (FDA) و مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) تلاش جمعی برای توسعه روش‌های تشخیص توکسین *بوتولینوم* در شرایط in vitro را انجام می‌دهند (۲۰). تاکنون، روش‌های مختلفی بر اساس سنجش سرولوژیکی ارائه شده است اما در این بین روش ELISA



چاهک	A	B	C	D	E	F	G
کنترل	IgGR+IgGM +MConj	IgGR+MConj	IgGR+Tox+ MConj	Tox+IgGR+ MConj	Tox+MConj	IgGM+MConj	MConj

IgGR: آنتی‌بادی خرگوشی، IgGM: آنتی‌بادی موشی، Tox: توکسین، MConj: آنتی‌بادی موشی کانژوگه.

نمودار ۳ نمودار ساندویچ الایزا- کف هر چاهک با مقدار ۲/۵ میکروگرم آنتی‌بادی خرگوشی پوشانده و روی آن در هر چاهک مقدار ۳۵ نانوگرم توکسین ریخته شد. سپس از چاهک اول مقدار ۱۰ میکروگرم آنتی‌بادی موشی تیتر شد. مشاهده شد که غلظت آنتی‌بادی برای تشخیص توکسین بالاتر از ۰/۶۲۵ میکروگرم مناسب است.



نمودار ۴ نمودار ساندویچ الایزا- کف هر چاهک با مقدار ۲/۵ میکروگرم آنتی‌بادی 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 قابل شناسایی است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، ما از روش ساندویچ الایزای تغییریافته جهت تشخیص توکسین *بوتولینوم* تیپ E استفاده نمودیم. آنتی‌توکسین تخلیص شده خرگوشی در کف میکروپلیت پوشانده شد که موجب گیرانداختن توکسین می‌شود. آنتی‌توکسین تخلیص شده موشی در بالای توکسین قرار می‌گیرد که موجب تشخیص 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.

امروزه جهت تشخیص باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* از تست‌های دقیق و حساسی مثل PCR و DNA-probe استفاده می‌شود. این روش‌ها، تنها قادر به تشخیص باکتری هستند و برای تشخیص توکسین باکتری بیشترین کاربرد را برای آنالیز غذاها داشته است (۲۳-۲۱). برای بهبود حساسیت سنجش، روش‌های تغییریافته ELISA مطرح شده است که پیشرفته‌ترین آن‌ها روش ساندویچ الایزا Digoxigenin-E-zyme Linked Immunosorbent Assay) DIG-ELISA) می‌باشد. این روش، سریع و بسیار اختصاصی بوده و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی دارد (۲۵، ۲۴).

تکنیک الایزا توسط Engvall & Perlmann در سال ۱۹۷۱ توصیف شده است که بعداً تغییراتی در این روش داده شد (۲۶). در سال ۱۹۷۹، اولین آزمایش برای تعیین توکسین *بوتولینوم* تخلیص شده با روش الایزا و آزمایش روی موش، توسط S. Notermans 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 آنتی‌ژن ثابت شده بودند، توانست آنتی‌بادی‌های 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 (۱۴). در سال ۱۹۸۴، تحقیقی برای تعیین حداقل مقدار توکسین مشخص شده بوسیله روش الایزا و آزمایش روی موش توسط Manouchehr Dezfulian انجام شد که حداقل مقدار آنتی‌ژن تعیین شده بوسیله روش دابل ساندویچ الایزا برابر دز کشنده ۵۰ درصد حدود ۱۰ موش محاسبه شد (۲۷). روش استاندارد برای تعیین آنتی‌بادی علیه توکسین *بوتولینوم*، آزمایش روی موش است. اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه نوروتوکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* توسط سنجش in vivo انجام می‌شود که در آن توکسین کشنده قبل از تزریق به موش خنثی‌سازی می‌شود. در گزارش‌های مختلفی ذکر شده که تکنیک الایزا با میکروپلیت‌های پوشیده شده از نوروتوکسین و دومین آنتی‌بادی‌های نشاندار شده می‌تواند نتایج قابل مقایسه‌ای بـا روش آزمـایش روی موش داشته باشد. در سـال

1- Double sandwich ELISA Assays

۱۹۹۴، Gorge J. Doellgast و همکـارانش چندین راهکـار ایمونواسـی برای اندازه‌گیری نوروتوکسین و آنتی‌توکسین تیپ A، B و E مطرح کردند. در یکی از این راهکارها، آنتی‌بادی مرغ و آنتی‌بادی‌های نشاندار شدهٔ RVV-XA به همراه نوروتوکسین انکوبه می‌شود. این کمپلکس به یک پلیت حاوی ایمونوگلوبولین G مرغ (IgG) باند می‌شود. از این روش برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی اختصاصی نیز استفاده می‌شود (۲۸).

از آنجا که مقدار بسیار ناچیز توکسین *بوتولینوم* موجب مرگ افراد می‌شود (در کشنده آن تقریباً ۱ نانوگرم برای هر کیلوگرم وزن بدن انسان می باشد) و از طرف دیگر، درمانی غیر از آنتی توکسین برای مسمومین آن وجود ندارد، لذا روش تشخیصی که بتواند مقدار بسیار اندک توکسین *بوتولینوم* را در زمان کوتاه شناسایی نماید، بسیار اهمیت دارد (۲۹، ۳). تاکنون، روش‌های مختلفی براساس سنجش سرولوژیکی توکسین بوتولینوم ارایه شده است؛ اما در این بین روش الایزا، بهترین و کاربردی‌ترین روش بوده است. برای بهبود حساسیت سنجش، روش‌های متفاوت الایزا مطرح شده است که پیشرفته‌ترین آن‌ها روش دابل ساندویچ الایزا است. روش تغییریافته دابل ساندویچ الایزا که ما در این تحقیق به آن دست یافتیم، برای تشخیص توکسین *بوتولینوم* تیپ E، سریع، بسیار اختصاصی و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی دارد. این روش جهت تشخیص سریع توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E و انجام اقدامات درمانی مناسب کاربرد دارد.

تشکر و قدردانی

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

References

1. Yule A M, Austin JW, Barkerian K, Cadieux B, Moccia RD. Persistence of Clostridium botulinum Neurotoxin Type E in Tissues from Selected Freshwater Fish Species: Implications to Public Health. J Food Prot. 2006; 69(5): 1164–1167.
2. 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(8):1059-70.
3. Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. Microbiol reviews. 1992; 56(1): 80-99.
4. Thajeb T, Chen Yi-Min, Dai Dao-Fu, Thajeb DD, Thajeb P. Botulism: A frequently forgotten old malady. Internation J Gerontol. 2007; 1(3): 118-124.
5. Phillips RW, Abbott D. High-throughput Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay (ELISA) electrochemiluminescent detection of botulinum toxins in foods for food safety and defense purposes. Food Addit. Contam. Part A Chem Anal Control. 2008;25(9):1084-8.
6. Austin JW, Sanders G. Detection of Clostridium botulinum and its toxins in suspect foods and clinical specimens. Ottawa: Food Directorate Publication. Compendium of analytical methods. 2009.
7. Betley MJ, Sugiyama H. Noncorrelation between mouse toxicity and serologically assayed toxin in clostridium botulinum type A culture fluids. Appl Environ Microbiol. 1979;38(2):297-300.
8. Grate JW, Ozanich RM, Warner MG, Bruckner-Lea CJ, Marks JD. Advances in Assays and Analytical Approaches for Botulinum Toxin Detection. Trends in Analytical Chemistry. TrAC. 2010; 29(10):1137-1156.
9. Szilagyi M, Rivera VR, Neal DM, Gerald A, Poli MA. Development of sensitive colorimetric capture elisa for Clostridium botulinum neurotoxin serotype A and B. Toxicon. 2000; 38(2). 381-389.
10. Čapek P, Dickerson TJ. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. Toxins. 2010; 2(1): 24-53.
11. Cai S, Singh BR, Sharma S. Botulism diagnostics: From clinical symptoms to in vitro assays. Crit Rev Microbiol. 2007; 33(2): 109–125.
12. Lindstrom M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(2): 298–314.
13. Sharma SK, Whiting RC. Methods for detection of Clostridium botulinum toxin in foods. J Food Prot. 2005; 68(6): 1256–1263.
14. Notermans S, Dufrenne J, Kozaki S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum type E toxin. Appl Environ Microbiol. 1979; 37(6): 1173–1175.
15. Volland H, Lamourette P, Nevers MC, Mazuet C, Ezan E, Neuburger LM, et al. A sensitive sandwich enzyme immunoassay for free or complexed Clostridium botulinum neurotoxin type A. J Immunol Methods. 2008; 330(1-2): 120–129.
16. Sharma Shashi K, Ferreira Joseph L, Eblen Brian S, Whiting Richard C. 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 Microbial. 2006; 72 (2): 1231–1238.
17. Minaei ME, Sa'adati M. Production of Clostridium botulinum Type E Antitoxin. Iranian J Milit Medicine. 2010; 12(1): 51-56. [Article in Persian]
18. Keller JE. Characterization of new formalin-detoxified botulinum neurotoxin toxoids. Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(9):1374-9.
19. Hielm S, Hyytig E, Ridell J, Korkeala H. Detection of Clostridium botulinurn in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. Internat J Food Microbiol. 1996; 31(1-3): 357-365.
20. Shone C, Ferreir J, Boyer A, Cirino N, Egan C, Evans E, et al. Aspects of Botulinum and Tetanus Neurotoxins. Workshop Review: Assays and Detection, The 5th International

Conference on Basic and Therapeutic, Neurotoxicity Research. 2006; 9(2,3): 205-216.
21. 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(3): 851–853.
22. 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. Applied and environmental microbiology. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(9): 3787–3792.
23. 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(1):206–216.
24. Depamede SN, Kisworo D. Development of Emzyme-Linkage Immunosorbent assay against Type B of Clostridium botulinum: A preliminary study. J Indonesian Trop Anim Agric. 2011; 36(4): 237-242.
25. 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(22): 7653–7657.
26. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochem. 1971; 8(1): 871–874.
27. 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(3): 645–648.
28. 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(10):6998–7005.
29. Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulism: Cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. Disaster Med. Public Health Prep. 2007; 1(1): 122–134.

Original Article

Double Sandwich ELISA modified method for the detection of Clostridium botulinum Type E

Minaei ME*, Saadati M

Faculty of Basic Science Imam Hossein University, Tehran, Iran

Received: 14 Feb 2013 Accepted: 05 May 2013

Abstract

Background & Objective: A very small amount of botulinum toxin can cause death and on the other hand, there is no cure for its poison other than antitoxin. Therefore, a diagnostic method that can detect very small amounts of botulinum toxin in a short time is very important. In this study, rapid and accurate detection of botulinum toxin type E has been performed with the double sandwich ELISA method.

Materials & Methods: based on the double sandwich ELISA method two different antibodies that bind to epitopes without the interference of antigens is required. For this purpose, the rabbit antibody was poured at the bottom (Capture antibody) and mouse antibody at the top of the toxin (Detection antibody) of each well and the toxin was titrated from the first wells. Then, the modified sandwich ELISA system was set up and optimized for the detection of botulinum toxin type E.

Results: The modified double sandwich ELISA method is able to detect Clostridium botulinum type E toxin to a value of 1 ng in less than 6 hours.

Conclusion: The modified double sandwich ELISA method is very precise and fast in detecting Clostridium botulinum type E. This method is used for determining specific antigen in the unknown sample.

Keywords: ***Clostridium botulinum*, botulinum toxin type E, antibodie, double sandwich ELISA**

*** Corresponding author: Minaei Mohammad Ebrahim,** Faculty of Basic Science Imam Hossein University, Tehran Iran.
Tel: +98 9352219503
Email: ebimomi@gmail.com