جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Iranian Journal of Military Medicine
Vol. 12, No. 1, Spring 2010
Pages: 51-56

مجله طب نظامی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹
صفحات: ۵۶-۵۱

تولید آنتی‌توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E

محمدابراهیم مینایی* *MSc*، **مجتبی سعادتی**[۱] *PhD*

*مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام‌حسین(ع)، تهران، ایران
[۱]مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام‌حسین(ع)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: توکسین بوتولینوم به‌عنوان قوی‌ترین توکسین شناخته می‌شود. از آنجایی که تیپ غالب در بیماران ایرانی که در اثر مصرف غذاهای آلوده به مسمومیت بوتولیزم دچار شده بودند، E است، این مطالعه با هدف، تولید آنتی‌توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E برای درمان مسمومیت‌های غذایی انجام شد.

روش‌ها: برای ایمن‌سازی حیوانات آزمایشگاهی (مرغ، موش و خرگوش)، ابتدا توکسویید با ادجوانت کامل فروند به شکل زیرجلدی یا داخل ماهیچه‌ای تزریق و در یادآور اول تا سوم، توکسویید با ادجوانت ناقص فروند تزریق شد. در فواصل و پایان تزریقات، خون‌گیری به عمل آمد و تیتر آنتی‌بادی تولیدشده با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: پس از تزریق هر یادآور، افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در تیتر آنتی‌بادی سرم حیوانات آزمایشگاهی دیده شد. تیتر آنتی‌بادی توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E در سرم مرغ، خرگوش و موش به بیش از ۱:۳۲۰۰ افزایش یافت. پس از تخلیص آنتی‌بادی، مقدار کمتر از ۰/۱۵۶ میکروگرم آنتی‌بادی تخلیص‌شده موشی و مقدار کمتر از ۰/۳۱۲ میکروگرم آنتی‌بادی تخلیص‌شده خرگوشی قادر به شناسایی توکسین بود.

نتیجه‌گیری: پس از تزریق توکسویید، آنتی‌بادی در بدن حیوان آزمایشگاهی افزایش می‌یابد. تولید آنتی‌توکسین اختصاصی تیپ E براساس واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی برای درمان مسمومیت غذایی ناشی از بوتولینوم ضروری است.

کلیدواژه‌ها: *کلستریدیوم بوتولینوم*، توکسین بوتولینوم تیپ E، آنتی‌توکسین

Production of *Clostridium botulinum* Type E Antitoxin

Minaei M. E.* *MSc*, **Sa'adati M.**[1] *PhD*

*Biological Research Center, Basic Sciences Faculty, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran
[1]Biological Research Center, Basic Sciences Faculty, Imam Hossein Comprehensive University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The Botulinum toxin is known as the most potent toxin. In Iranian population, the type E is prevalent in individuals being poisoned by using contaminated foods (especially canned fish). So, the purpose of this study was to produce *Clostridium botulinum* type E antitoxin for treatment of food poisoning.

Methods: For immunization of lab animals (chicken, mouse and rabbit),at first, the toxoid was injected with Freund's complete adjuvant either subcutaneously or intramuscularly and in the first to third booster injection ,it was injected with Freund's incomplete adjuvant. At the end or intervals of injections, blood sampling was done and the produced antibody's titer was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay or ELISA method.

Results: After each booster injection, a considerable increase in serum antibody titer of lab animals was seen. The titer of *Clostridium botulinum* type E toxin antibodies in the serum of chicken, rabbit and mouse increased to more than 1:3200. After purification of antibody, less than 0.156 microgram of the purified mouse antibody and less than 0.312 microgram of rabbit purified antibody were able to detect the toxin.

Conclusion: After the injection of toxoid, antibody increase in the body of lab animal. Production of type E specific antitoxin based on reaction between antigen and antibody is necessary for treatment of poisoning.

Keywords: *Clostridium botulinum*, Botulinum Toxin Type E, Antitoxin

نویسنده مسئول: محمدابراهیم مینایی. تمام درخواست‌ها باید به نشانی ebimomi@gmail.com فرستاده شوند.

دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۱۲ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۱/۲۸

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

در سال ۱۸۹۷، *فون ارمنگن* نشان داد که بیماری بوتولیزم بر اثر تولید توکسین توسط باکتری بی‌هوازی ایجاد می‌شود. *کلستریدیوم بوتولینوم* براساس خصوصیات توکسینی که تولید می‌کند، دارای هفت تیپ مختلف (A تا G) است. توکسین بوتولینوم در ابتدا به شکل پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای با وزن مولکولی تقریباً ۱۵۰ kDa سنتز می‌شود که حداقل دارای یک باند دی‌سولفیدی داخل زنجیره‌ای است. این مولکول در حد خیلی ضعیفی فعال است. هنگامی که این توکسین به‌وسیله پروتئازها شکسته می‌شود، به یک پلی‌پپتید دو زنجیره‌ای با زنجیره سنگین (H) به وزن تقریبی ۱۰۰ kDa و زنجیره سبک (L) به وزن تقریبی ۵۰ kDa تبدیل می‌شود که کاملاً فعال است. از میان هفت سروتیپ مختلف توکسین بوتولینوم، سروتیپ‌های A، B و E، بیشتر در انسان بیماری ایجاد می‌کنند. [۱، ۲، ۳، ۴].

تهیه آنتی‌توکسین استاندارد اولین بار برای تیپ A، B و C *کلستریدیوم بوتولینوم* در ایالات متحده، توسط *بنگستون* انجام شد. وی مقـــداری از آنتی‌توکسین را با ۱۰۰MLD توکسین مخلوط کرد و کمترین مقدار آنتی‌توکسین که مرگ خوکچه هندی ۲۵۰گرمی را به‌مدت ۹۶ ساعت به تاخیر می‌انداخت را به‌عنوان ۰/۱ واحد در نظر گرفت. به‌خاطر توانایی زیاد این آنتی‌توکسین‌ها، آنها به‌عنوان استانداردهای بین‌المللی پذیرفته شدند. تهیه استاندارد آنتی‌توکسین‌های *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ A، B، C، D و E برای تخمین توانایی درمانی آنتی‌توکسین‌ها و همچنین برای شناسایی جدایه‌های توکسیژنیک *کلستریدیوم بوتولینوم* لازم است [۵، ۶، ۷].

برای شناسایی باکتری کلستریدیوم بوتولینوم، آزمایش‌هایی نظیر "مشاهده مستقیم و بررسی میکروسکوپی نمونه"، "رنگ‌آمیزی (ساده، مرکب و اختصاصی)"، "کشت و بررسی کلنی‌ها"، "کشت در محیط‌های اختصاصی، 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 مولکولی برای شناسایی باکتری *کلستریدیوم بوتولینوم* استفاده می‌شود. حساسیت این تست‌ها بسیار زیاد است؛ اما تنها قادر به تشخیص باکتری هستند و این روش‌ها برای شناسایی توکسین باکتری کارآیی ندارند.

در حال حاضر، روشی که برای شناسایی توکسین بوتولینوم بیشترین حساسیت را دارد و کمترین مقدار توکسین را تعیین می‌کند (تا حدود ۵ تا ۱۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر)، آزمایش روی موش آزمایشگاهی *در زیوه* است. برای اینکه روش دیگری جایگزین شود، باید دارای حساسیت حداقل دو برابری روی موش و همان ویژگی‌ها باشد [۸].

سنجش سرولوژیـک توکسین بوتولینـوم در شرایط خارج از بدن، براساس واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی (آنتی‌توکسین با تیپ سرولوژیک همان توکسین) انجام می‌شود. در مطالعات اولیه کمیت آنتی‌ژن با روش‌های هماگلوتیناسیون، هماگلوتیناسیون تسهیل‌شده، ایمونودیفیوژن و رادیوایمونواسی، سنجیده می‌شد. در مطالعات بعدی، روش‌های اختصاصی برای شناسایی توکسین‌ها طراحی شد [۹، ۱۰]. از بهترین روش‌های ایمونواسی، تکنیک "ساندویچ الایزا" است. در روش 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 یا از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تخلیص‌شده استفاده می‌کنند (مانند آنتی‌توکسین تخلیص‌شده موشی و خرگوشی علیه توکسین بوتولینوم) [۹، ۱۰، ۱۱].

از میان ده‌ها مورد ثبت‌شده مسمومیت غذایی ناشی از بوتولینوم در ایران، بیشترین فراوانی مربوط به توکسین تیپ E بوده است که ضرورت تولید آنتی‌توکسین این تیپ را نشان می‌دهد.

با توجه به نیاز به آنتی‌توکسین تیپ E در درمان مسمومیت‌های غذایی ناشی از جدایه‌های *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E و تشخیص توکسین در مواد غذایی آلوده، هدف از انجام این پژوهش، تولید آنتی‌توکسین علیه سروتایپ E در موش، خرگوش و مرغ برای مصارف درمانی بود.

روش‌ها

الف) تبدیل توکسین به توکسوئید (سم زدایی): تهیه آنتی‌توکسین‌ها علیه اگزوتوکسین‌های باکتریایی، به‌وسیله ایمن‌سازی حیوانات انجام شد. در ابتدا توکسین به‌وسیله فرمالدیید تیمار شد و خاصیت سمی خود را از دست داد [۱۲]. برای تبدیل توکسین به توکسوئید از فرمالدیید ۳۷٪ (Merck: 3999؛ آلمان) استفاده شد. مقدار یک میلی‌گرم از توکسین بوتولینوم تیپ E در یک میلی‌لیتر بافر PBS با pH ۷ حل شد. فرمالین ۳۷٪ در غلظت نهایی ۰/۲٪ به توکسین اضافه و نمونه در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از ۴ روز، برای اطمینان از غیرفعال‌شدن سم، مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن توسط بافر PBS به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و به صفاق دو موش تزریق شد (به هر موش ۱۸گرمی ۰/۵ میلی‌لیتر) و تا ۴ روز رفتار موش‌ها بررسی گردید. زنده‌ماندن موش‌ها دلیل بر سم‌زدایی در نظر گرفته شد [۱۳، ۱۴، ۱۵].

ب) فرمالین‌زدایی: از آنجایی که امکان داشت فرمالین در بدن حیوانات آزمایشگاهی (موش، خرگوش و مرغ) اثرات سمی داشته باشد، لازم است که از بافر خارج شود. برای این منظور نمونه دیالیز (Sigma: D 6066 cut off 12kDa؛ ایالات متحده)، شد. دیالیز در مقابل دو لیتر بافر PBS با pH ۷ انجام گرفت. هر ۱۲ ساعت و به تعداد ۴ مرتبه بافر PBS تعویض شد (هر لیتر PBS حاوی ۸ گرم NaCl، ۰/۲ گرم KCl، ۰/۲۹ گرم Na2Hpo4.12H2O و ۰/۲ گرم KH2PO4 بود). پس از دیالیز، توکسوئید با روش برادفورد پروتئین‌سنجی شد [۱۳، ۱۴، ۱۶].

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ج) مخلوط‌کردن توکسوئید با ادجوانت: مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از توکسوئید درون لوله اپندروف ریخته و هم حجم آن ادجوانت اضافه شد. لوله اپندروف توسط دستگاه شیکر به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده و به سرنگ منتقل شد و توسط یک سرسوزن رابط دو سرنگ به هم مرتبط شدند. این کار تا زمانی ادامه یافت که مخلوط کاملاً سفت و رنگ آن کاملاً شیری شد. در تزریق اول به خرگوش و موش از ادجوانت کامل فروند (Sigma: F5881؛ ایالات متحده) و در تزریق یادآورها و همچنین تزریق اول به مرغ از ادجوانت ناقص فروند (Sigma: F5506؛ ایالات متحده) استفاده شد [۱۳، ۱۵، ۱۷].

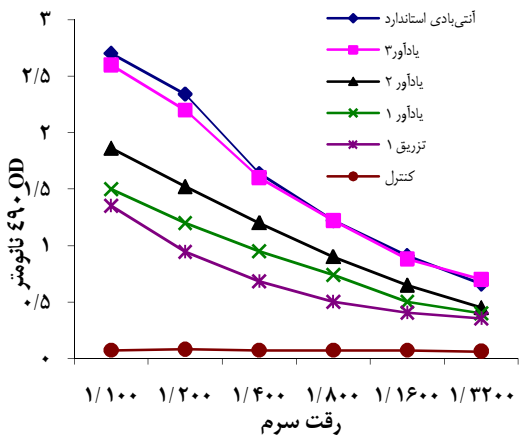
د) تزریق توکسوئید به موش، خرگوش و مرغ: ۱۰۰ میکروگرم توکسوئید به‌صورت زیرجلدی در چند نقطه پشت گردن خرگوش (نژاد نیوزیلندی از انستیتو پاستور ایران) تزریق شد. ۳ تزریق یادآور به فاصله ۲ هفته از یکدیگر انجام شد. ۱۰ روز پس از هر تزریق یادآور به‌منظور بررسی میزان تولید آنتی‌بادی، از گوش خرگوش خون‌گیری شد. برای تزریق توکسوئید به مرغ (نژاد لگهورن از شرکت دام و طیور وزارت کشاورزی)، ۵۰ میکروگرم از توکسوئید با ادجوانت ناقص فروند مخلوط و در چند نقطه از عضله سینه مرغ تزریق شد. ۳ تزریق یادآور انجام و ۱۰ روز پس از هر یادآور، از رگ زیر بال مرغ خون‌گیری شد. برای تزریق توکسوئید به موش (سفید آزمایشگاهی از انستیتو پاستور ایران)، ۵ میکروگرم از توکسوئید به‌صورت داخل صفاقی و زیرجلدی تزریق شد. ۳ تزریق یادآور انجام و ۱۰ روز پس از هر تزریق یادآور، از چشم موش خون‌گیری شد [۱۵]. در کنار هر سری از تزریقات به مرغ، موش و خرگوش، به یک گروه شاهد شامل دو حیوان آزمایشگاهی مشابه به همان میزان توکسین تزریق و رفتار حیوان آزمایشگاهی بررسی شد.

ه) تعیین تیتر آنتی‌بادی به روش الایزای غیرمستقیم: ابتدا مقدار ۲۰ میکروگرم از توکسین در یک میلی‌لیتر بافر کربنات- بی‌کربنات (pH=۹/۶) حل و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر چاهک الایزا ریخته شد و پلیت به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، محتویات چاهک‌ها دور ریخته و با بافر شست‌وشو (PBS حاوی ۰/۰۵٪ Tween20) شسته و خشک شد. در چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر بافر بلاکینگ (PBS حاوی ۰/۰۵٪ Tween20 و ۱٪ آلبومین سرم گاو) افزوده شد و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از شست‌وشو و خشک‌کردن میکروپلیت (NUNC؛ دانمارک)، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱:۱۰۰ تا ۱:۶۴۰۰۰ از آنتی‌بادی در چاهک‌ها ریخته و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از شست‌وشو و خشک‌کردن میکروپلیت، از آنتی‌بادی ضدIgG مرغی (Sigma: A9046؛ ایالات متحده)، خرگوشی (Dako: P0448؛ دانمارک) یا موشی (Dako: P0447؛ دانمارک) کانژوگه به آنزیم پراکسیداز با رقت مناسب به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شد و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از شست‌وشو و خشک‌کردن میکروپلیت، به تمامی چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا که ۶ میلی‌گرم OPD (Sigma: P1526؛ ایالات متحده) حل‌شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سیترات‌فسفات با pH ۵ به‌علاوه ۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۷٪بود افزوده و در تاریکی قرار داده شد. در پایان، به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۱ مولار برای توقف واکنش اضافه و در طول موج ۴۹۰ نانومتر جذب نوری خوانده شد [۱۳، ۱۸، ۱۹].

و) تخلیص آنتی‌بادی تایپ E با ستون Gپروتئین: برای تخلیص آنتی‌بادی موجود در سرم حیوان آزمایشگاهی از ستون Gپروتئین استفاده شد. ستون Gپروتئین داری تمایل ترکیب بالایی با ایمونوگلوبولین‌های IgG است و قادر به جداسازی انواع ایمونوگلوبولین‌های IgG1، IgG2، IgG3 و IgG4 از سرم است که نسبت به ستون Aپروتئین تمایل ترکیب بالاتری دارد. این ستون برای جداسازی آنتی‌بادی در سرم موش و خرگوش نیز از ستون Aپروتئین مناسب‌تر است [۱۶، ۲۰]. برای تخلیص آنتی‌بادی ابتدا ستون Gپروتئین به تعادل (با تریس ۱۰۰ میلی‌مولار و سپس با تریس ۱۰ میلی‌مولار) رسانده شود. معادل ۰/۱ حجم سرم نمونه، تریس ۱ مولار افزوده شد تا pH برابر ۸ گردید و نمونه سرم حیوان آزمایشگاهی از بالای ستون تزریق شد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر بافر گلایسین ۱۰۰ میلی‌مولار با pH ۳ از بالای ستون اضافه شد. برای جمع‌آوری نمونه‌ها از لوله اپندروف استفاده شد و به هر کدام از آنها ۵۰ میکرولیتر تریس ۱ مولار اضافه شد تا هنگام جمع‌آوری نمونه‌ها pH از ۳ به ۸ برسد. در مرحله آخر، تراکم نوری هر کدام از لوله‌ها با طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. به‌منظور بررسی روند تخلیص آنتی‌بادی از سرم موش و خرگوش، از SDS-PAGE (۱۲٪)، پروتئین‌سنجی به روش برادفورد و آزمایش الایزای غیرمستقیم استفاده شد.

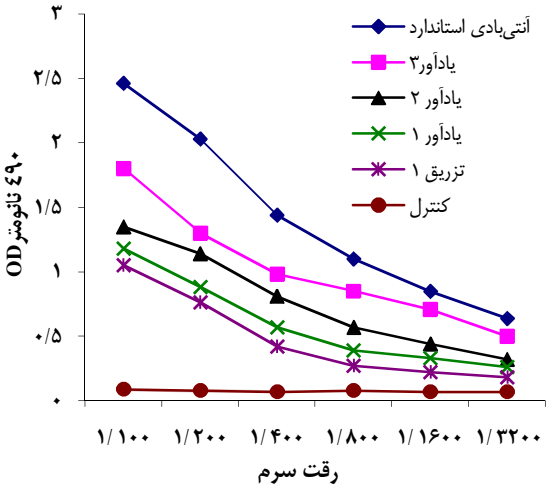
نتایج

پس از تزریق اول توکسوئید به مرغ، میزان تیتر آنتی‌بادی علیه توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E تا رقت ۱:۱۶۰۰ افزایش یافت که این تیتر در تزریق یادآورها به ۱:۳۲۰۰ و بالاتر رسید (نمودار ۱).



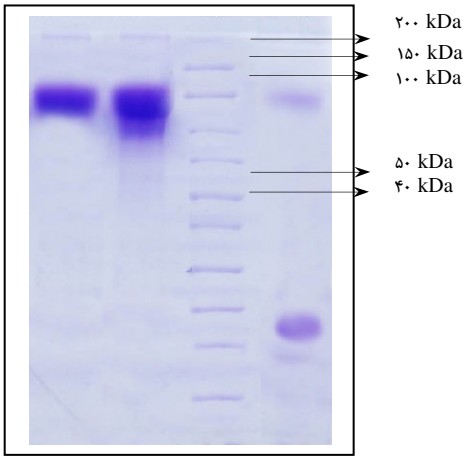
نمودار ۱) تیتراسیون سرم مرغ پس از هر بار تزریق

Archive OF SID



نمودار ۲) تیتراسیون سرم خرگوش پس از هر بار تزریق

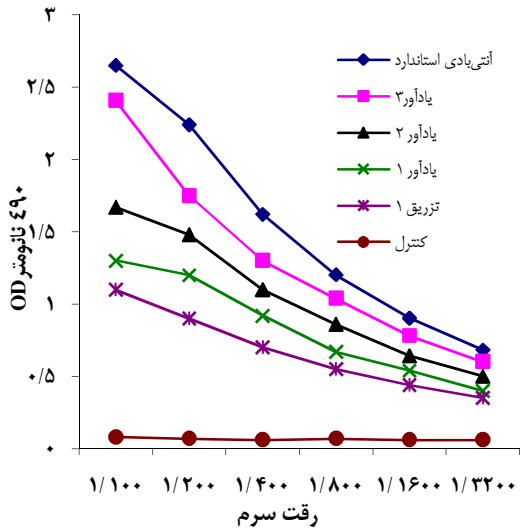
در خرگوش پس از تزریق اول، میزان تیتر آنتی‌بادی تا رقت ۱:۸۰۰ افزایش یافت که این تیتر در تزریق یادآورها به ۱:۳۲۰۰ و بالاتر رسید (نمودار ۲). افزایش تیتر آنتی‌بادی در موش پس از تزریق اول تا رقت ۱:۱۶۰۰ بود که این تیتر در تزریق یادآورها به ۱:۳۲۰۰ و بالاتر رسید (نمودار ۳).



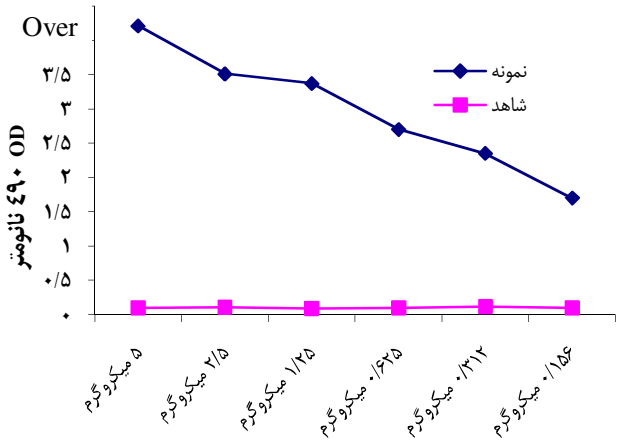
شکل ۱) ژل SDS-PAGE سرم عبور داده‌شده از ستون Gپروتئین- آنتی-بادی موجود در سرم خرگوش و موش به‌خوبی تخلیص شد و دارای یک باند مشخص با وزن تقریبی ۱۵۰ کیلودالتون بود. آنتی‌بادی تخلیص‌شده سرم خرگوش در مجاورت 2ME شکسته شده و بخشی از آن یک باند با وزن تقریبی ۴۵ کیلودالتون را نشان داد (ردیف ۱: سرم خرگوش عبور داده‌شده از ستون بدون 2ME؛ ردیف ۲: سرم موش عبور داده‌شده از ستون بدون 2ME؛ ردیف ۳: مارکر پروتئینی SM 0661 فرمنتاز؛ ردیف ۴: سرم خرگوش عبور داده‌شده از ستون دارای 2ME)

نتایج روند تخلیص آنتی‌بادی از سرم موش و خرگوش با الکتروفورز و الایزای غیرمستقیم در شکل ۱ آمده است.

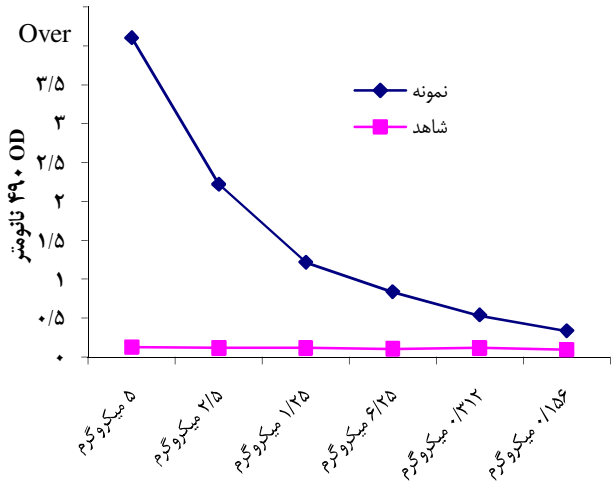
آنتی‌توکسین به‌خوبی تخلیص شد و با توکسین خود به خوبی واکنش داد. کمتر از ۰/۱۵۶ میکروگرم آنتی‌بادی تخلیص‌شده موشی و کمتر از ۰/۳۱۲ میکروگرم آنتی‌بادی تخلیص‌شده خرگوشی قادر به شناسایی توکسین بودند (نمودارهای ۴ و ۵).



نمودار ۳) تیتراسیون سرم موش پس از هر بار تزریق



نمودار ٤) تیتراسیون آنتی‌بادی موشی پس از تخلیص سرم



نمودار ۵) تیتراسیون آنتی‌بادی خرگوشی پس از تخلیص سرم

Archive OF SID

بحث

در این تحقیق، آنتی‌توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تیپ E تهیه شد. آنتی‌توکسین، در شناسایی جدایه‌های *کلستریدیوم بوتولینوم* توکسیژنیک و همچنین درمان مسمومیت ناشی از این توکسین کاربرد دارد.

در بُعد شناسایی و تشخیص، هنوز آزمایش روی موش آزمایشگاهی *در زیوه* برای شناسایی توکسین‌های بوتولینوم، حساس‌ترین و بهترین روش است. ولی به‌دلیل مشکلات کار با حیوان آزمایشگاهی، مدیریت دارو و غذا و مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها، تلاش جمعی برای توسعه روش‌های شناسایی توکسین بوتولینوم *در شیشه* را انجام می‌دهند [۲۱]. تاکنون، روش‌های مختلفی براساس سنجش سرولوژیکی ارایه شده است؛ اما 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 است. این روش سریع (کمتر از ۶ ساعت)، بسیار اختصاصی و حساسیتی معادل آزمایش روی موش آزمایشگاهی دارد. برای انجام این آزمایش، به دو آنتی‌بادی که به اپیتوپ‌های بدون تداخل روی آنتی‌ژن متصل می‌شوند، نیاز است [۲۱]. در این تحقیق، آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تخلیص‌شده موشی و خرگوشی، علیه توکسین بوتولینوم تایپ E که برای آزمایش ساندویچ الایزا لازم است، تهیه شد.

تنها داروی در دسترس پس از آلودگی با توکسین بوتولینوم، استفاده از آنتی‌توکسین است. البته آنتی‌بادی‌تراپی علایم بوتولیزم را از بین نمی‌برد ولی مقدار توکسینی که در پایانه‌های اعصاب وارد شده‌اند را محدود می‌کند؛ بنابراین شدت بیماری را کمتر و مدت بیماری را کوتاهتر می‌کند. آنتی‌توکسین می‌تواند برای درمان بیماری مورد استفاده قرار گیرد [۲۲].

تنها راه پیشگیری از بیماری بوتولیزم، واکسیناسیون است. یک توکسوئید بوتولینوم پنج‌ظرفیتی شامل کمپلکس توکسین‌های بوتولینوم تایپ A، B، C، D و E سم‌زدایی‌شده به‌وسیله فرمالین، برای ایجاد مصونیت در کارکنان آزمایشگاه‌ها از سال ۱۹۶۱ مورد استفاده قرار گرفته است که البته هرگز برای آن مجوز استفاده توسط FDA ایالات متحده صادر نشده است [۲۳].

به‌جز ایالات متحده، با همکاری سه آزمایشگاه اصلی ژاپنی در سال‌های اخیر، یک توکسوئید بوتولینوم چهارظرفیتی از سروتایپ‌های A، B، E و F برای افراد در معرض خطر ابتلا به مسمومیت بوتولیزم ساخته شده است [۲۴].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ توسط *ای‌کیلر*، روی تبدیل توکسین بوتولینوم به توکسوئید از طریق فرمالین انجام شده، نشان داد که این توکسوئید می‌تواند حفاظت مطلوبی ایجاد کند و این میزان به شرایط واکنش، طی سم‌زدایی بستگی دارد. همچنین آزمایشات انجام‌شده *در شیشه* و *در زیوه* نشان داد که توکسوئیدهای جدید تقریباً با توکسین اصلی به لحاظ ایمونوژنیسیتی برابرند و به‌نظر می‌رسد از سایر واکسن‌های بوتولینوم برتر باشند [۱۱].

توکسوئید پنج‌ظرفیتی شامل کمپلکس بوتولینوم از سروتیپ‌های مختلف و هماگلوتینین آنها و همچنین بوتولینوم نوترکیب (قطعه C) به‌عنوان واکسن است؛ اما همانند توکسوئید جدید بوتولینوم نمی‌توانند پاسخ ایمنی را برای تولید آنتی‌بادی دارای تشخیص متقاطع از نوروتوکسین اصلی تحریک نمایند [۱۱].

یکی از روش‌های تولید توکسوئید، افزودن فرمالین تجارتی (فرمالدئید ۳۷٪) به توکسین تخلیص‌شده است. در تحقیقی که توسط *جی‌باونر* در سال ۱۹۶۳ انجام شده است، برای تبدیل توکسین به توکسوئید در مورد تیپ A و B مقدار ۰/۴٪، تیپ C و D مقدار ۰/۳٪ و تیپ E مقدار ۰/۲٪ فرمالین به توکسین به‌دست آمده افزوده شده است. سپس این مخلوط در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ تا ۴ هفته نگهداری می‌شود. توکسین تیپ E برای تبدیل به توکسوئید به زمان کمتری نیاز دارد. برای اطمینان از غیرسمی‌شدن توکسین، توکسوئید حاصل به موش تزریق می‌شود. سپس با افزودن فسفات آلومینیوم به توکسوئید و نگهداری آن در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب، توکسوئید رسوب داده می‌شود. تیپ‌های A، B، C و E با غلظت ۰/۵٪ فسفات آلومینیوم رسوب می‌کنند، درحالی که مقدار ۱٪ فسفات آلومینیوم به تیپ D باید افزوده شود. در گزارش دیگری، برای تبدیل توکسین تخلیص‌شده تیپ E به توکسوئید، مقدار ۰/۶٪ فرمالین به آن افزوده و در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. این توکسین فرمالینه، برای اطمینان از فقدان خاصیت سمیّت، به موش تزریق می‌شود. هنگامی که این موش‌ها زنده ماندند، توکسین به توکسوئید تبدیل شده است. سپس با فسفات آلومینیوم، توکسوئید جذب می‌شود [۶، ۱۴، ۱۷].

برای تهیه توکسوئید، در مقاله دیگری آمده است که ۰/۴٪ فرمالین به توکسین تیپ E تخلیص‌شده افزوده و به‌مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده است. سپس برابر حجم این توکسوئید، ادجوانت کامل فروند اضافه و کاملاً مخلوط شده است. این مخلوط به‌منظور تولید آنتی‌بادی برای تزریق اول به خرگوش مناسب است. برای تزریق یادآور به خرگوش و همچنین تزریق به مرغ، توکسین تخلیص‌شده با ادجوانت ناقص فروند مخلوط می‌شود. در تمام موارد فوق، توکسین به‌صورت ناقص تخلیص شده است؛ ولی تولید آنتی‌توکسین علیه تیپ E *کلستریدیوم بوتولینوم*، موفقیت‌آمیز گزارش شده است [۵، ۶، ۱۵].

در این تحقیق، برای تهیه توکسوئید از روش *نوترمانز* پیروی شده است. پس از تزریق توکسین فرمالینه به موش‌ها، مشاهده شد که آنها علایم مسمومیّت نشان ندادند و زنده ماندند. همچنین، از روش الایزای غیرمستقیم برای تعیین تیتر آنتی‌بادی استفاده شد. تکنیک الایزا، توسط *انگ‌وال* و *پرل‌مان* در سال ۱۹۷۱ توصیف شده است که بعداً تغییراتی در این روش داده شد. در سال ۱۹۷۹، اولین آزمایش

Archive OF SID

برای تعیین توکسین *کلستریدیوم بوتولینوم* تخلیص‌شده با روش الایزا و آزمایش روی موش، توسط *نوترمانز* 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 به‌عنوان آنتی‌ژن ثابت شده بودند، توانست آنتی‌بادی‌های علیه توکسین بوتولینوم در سرم دو بیمار مبتلا به بوتولیزم نوزادان را نشان دهد [۱۸، ۱۹، ۲۵، ۲۶]. در این تحقیق، برای انجام آزمایش الایزای غیرمستقیم، کف میکروپلیت‌ها از توکسین پوشیده شد و سرم به‌دست‌آمده از خون خرگوش، مرغ و موش روی آن ریخته شد. سپس آنتی‌بادی نشاندار با آنزیم، به هر چاهک افزوده شد. در انتها، سوبسترا افزوده شد که باعث انجام واکنش رنگی در هر چاهک می‌شود. در هر آزمایش الایزا، در یک ستون برای کنترل آزمایش، از آنتی‌بادی استاندارد تیتر می‌شد. آنتی‌بادی استاندارد، از نوع اسبی و به‌طور اختصاصی علیه تیپ E بود.

نتیجه‌گیری

آنتی‌توکسین اختصاصی تولیدشده علیه توکسین بوتولینوم تایپ E برای تشخیص، پیشگیری و درمان مسمومیت غذایی ناشی از مصرف غذاهای آلوده کاربرد دارد.

منابع

1- Arnon SS, Schecter R, Ingleshy TV. Botulinum toxin as biological weapons. JAMA. 2001;285:1059-70.
2- Montecucco C, Schiavo G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. Rev Biophys. 1995;28(4):423-72.
3- Silvaggi NR, Boldt GE, Hixon MS, Kennedy JP, Tzipori S, Kim D, et al. Structures of clostridium botulinum neurotoxin serotype A light chain complexes with small-molecule inhibitors highlight active-site flexibility. Chem Biol. 2007;14:533-42.
4- Dressler D, Saberi FA, Barbosa ER. Botulinum toxin mechanisms of action. Arq Neuropsiquiatr. 2005;63(1):180-5.
5- Lynn S. Human immune response to botulinum pentavalent (ABCDE) toxoid determined by a neutralization test and by an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 1988;26(11):2341-6.
6- Jones RGA, Liu Y, Rigsby P, Sesardic D. An improved method for development of toxoid vaccines and antitoxins. J Immunol Methods. 2008;337:42-8.
7- Zeng M, Xu Q, Elias M, Pichichero E, Simpson LL, Smith LA. Protective immunity against botulism provided by a single dose vaccination with an adenovirus-vectored vaccine. Vaccine. 2007;25:7540-8.
8- 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.
9- 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.
10- Austin JW, Sanders G. Detection of Clostridium botulinumand its toxins in suspect foods and clinical specimens. Ottawa: Food Directorate Publication; 2009.
11- Keller JE. Characterization of new formalin-detoxified botulinum neurotoxin toxoids. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(9):1374-9.
12- Wictome M, Newton K, Hallis B, Dunnigan P, Mackay E, Clarke S, et al. Development of an invitro bioassay clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is move sensitive than the mouse bioassay. Appl Environ Microbiol. 1999;65:3787-92.
13- Jones Russell GA, Liu Y, Rigsby P, Sesardic D. An improved method for development of toxoid vaccines and antitoxins. J Immunol Methods. 2008;337:42-8.
14- Bowmer EJ. Preparation and assay of the international standards for clostridium botulinum types A, B, C, D and E antitoxins. Bull Org Mond Sante. 1963;29:701-9.
15- 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.
16- Huse K, Bohme HJ, Scholz GH. Review article: Purification of antibodies by affinity chromatography. J Biochem Biophys Methods. 2002;51:217-31.
17- Flock MA, Yarinsky A, Duff JT. Studies on immunity to toxins of clostridium botulinum: Purification and detoxification of trypsin-activated type E toxin. USA: Army Chemical Corps; 1961.
18- 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(5):645-8.
19- Doellgast GJ. 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):851-3.
20- Harlow ED, Lane D. Antibody purification on protein A or protein G columns Harlow and Lane cold spring harbor protocols. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
21- Shone C, Ferreir J, Boyer A, Cirino N, Egan C, Evans E, et al. Aspects of botulinum and tetanus neurotoxins. Neurotox Res. 2006;9(3):205-16.
22- Arnon SS, Schechter R, Maslanka SE, Jewell NP, Hatheway CL. Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism. N Engl J Med. 2006;354:462-71.
23- Pittman PR, Hack D, Mangiafico J, Gibbs P, McKee KT. Antibody response to a delayed booster dose of anthrax vaccine and botulinum toxoid. Vaccine. 2002;20:2107-15.
24- Torii YY, Tokumaru S, Kawaguchi N, Izumi S, Maruyama M. Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid. Vaccine. 2002;20:2556-61.
25- Rubin LG, Dezfulian M, Yolken RH. Serum antibody response to clostridium botulinum toxin in infant botulism. J Clin Microbiol. 1982;16:770-1.
26- 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.