

تولید آنتی توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E

محمدابراهیم مینایی* MSc، مجتبی سعادت^۱ PhD

*مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام‌حسین^(ع)، تهران، ایران
^۱مرکز 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 توکسوئید با ادجوانت کامل فروند به شکل زیرجلدی یا داخل ماهیچه‌ای تزریق و در یادآور اول تا سوم، توکسوئید با ادجوانت ناقص فروند تزریق شد. در فواصل و پایان تزریقات، خون‌گیری به عمل آمد و تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: پس از تزریق هر یادآور، افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در تیتراژ آنتی‌بادی سرم حیوانات آزمایشگاهی دیده شد. تیتراژ 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 توکسوئید، 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

¹Biological 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

مقدمه

در سال ۱۸۹۷، فون/رمنگن نشان داد که بیماری بوتولیزم بر اثر تولید توکسین توسط باکتری بی‌هوازی ایجاد می‌شود. کلاستریدیوم 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 کلاستریدیوم بوتولینوم در ایالات متحده، توسط بنگستون انجام شد. وی مقداری از آنتی‌توکسین را با ۱۰۰ MLD توکسین مخلوط کرد و کمترین مقدار آنتی‌توکسین که مرگ خوچه هندی ۲۵۰ گرمی را به مدت 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 کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ A، B، C، D و E برای تخمین توانایی درمانی آنتی‌توکسین‌ها و همچنین برای شناسایی جدایه‌های توکسیژنیک کلاستریدیوم بوتولینوم لازم است [۵، ۶، ۷]. برای شناسایی باکتری کلاستریدیوم 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 کلاستریدیوم بوتولینوم استفاده می‌شود. حساسیت این تست‌ها بسیار زیاد است؛ اما تنها قادر به تشخیص باکتری هستند و این روش‌ها برای شناسایی توکسین باکتری کارایی 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 سرولوژیک توکسین بوتولینوم 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 هم‌گلو‌تیناسیون، هم‌گلو‌تیناسیون تسهیل‌شده، ایمونودیفیوژن و رادیوایمونواسی، سنجیده می‌شود. 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 کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ E و تشخیص توکسین در مواد غذایی آلوده، هدف از انجام این پژوهش، تولید آنتی‌توکسین علیه سروتیپ 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 فرمالدئید تیمار شد و خاصیت سمی خود را از دست داد [۱۲]. برای تبدیل توکسین به توکسوئید از فرمالدئید 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 غیرفعال شدن سم، مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن توسط بافر PBS به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و به صفاق دو موش تزریق شد (به هر موش ۱۸ گرمی ۰/۵ میلی‌لیتر) و تا ۴ روز رفتار موش‌ها بررسی گردید. زنده‌ماندن موش‌ها دلیل بر سم‌زدایی در نظر گرفته شد [۱۳، ۱۴، ۱۵].

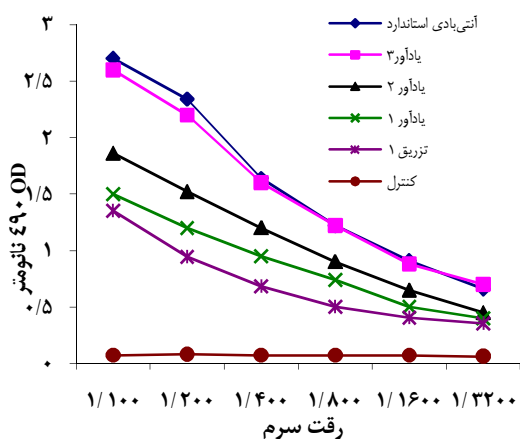
ب) فرمالین‌زدایی: از آنجایی که امکان داشت فرمالین در بدن حیوانات آزمایشگاهی (موش، خرگوش و مرغ) اثرات سمی داشته باشد، لازم است که از بافر خارج شود. برای این منظور نمونه دیالیز (Sigma: D cut off 12kDa 6066؛ ایالات متحده)، شد. دیالیز در مقابل دو لیتر بافر PBS با pH ۷ انجام گرفت. هر ۱۲ ساعت و به تعداد ۴ 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].

چاهک‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا که ۶ میلی‌گرم OPD (Sigma: P1526؛ ایالات متحده) حل شده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سترات فسفات با pH ۵ به علاوه 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 G پروتئین: برای تخلیص آنتی‌بادی موجود در سرم حیوان آزمایشگاهی از ستون G پروتئین استفاده شد. ستون G پروتئین 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 A پروتئین تمایل ترکیب بالاتری دارد. این ستون برای جداسازی آنتی‌بادی در سرم موش و خرگوش نیز از ستون A پروتئین مناسب‌تر است [۱۶، ۲۰]. برای تخلیص آنتی‌بادی ابتدا ستون G پروتئین 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 گلاسیسین 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. به منظور 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 تیتراژ آنتی‌بادی علیه توکسین کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ E با رقت ۱:۱۶۰۰ افزایش یافت که این تیتراژ در تزریق یادآورها به ۱:۳۲۰۰ و بالاتر رسید (نمودار ۱).

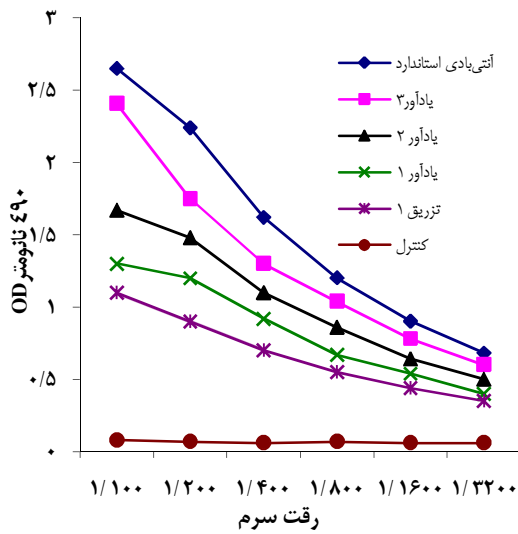


نمودار ۱) تیتراژ آنتی‌بادی علیه توکسین کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ E با رقت ۱:۱۶۰۰ افزایش یافت که این تیتراژ در تزریق یادآورها به ۱:۳۲۰۰ و بالاتر رسید (نمودار ۱).

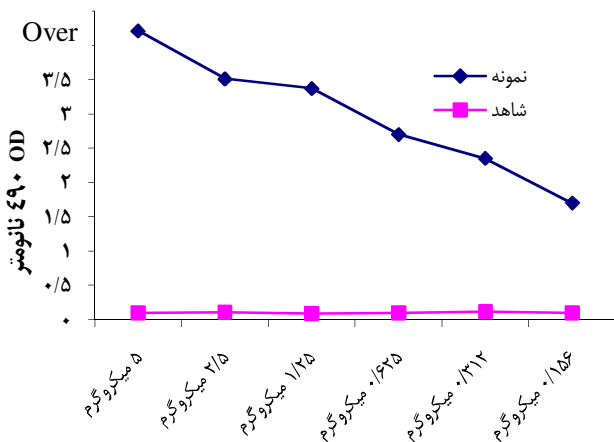
ج) مخلوط کردن توکسوئید با ادجوانت: مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از توکسوئید درون لوله اپندروف ریخته و هم حجم آن ادجوانت اضافه شد. لوله اپندروف توسط دستگاه شیکر به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده و به سرنگ منتقل شد و توسط یک سرسوزن رابط دو سرنگ به هم مرتبط شدند. این کار تا زمانی ادامه یافت که مخلوط کاملاً سفت و رنگ آن 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 به صورت 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 به منظور 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 به صورت 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 تیتراژ آنتی‌بادی به روش الایزای غیرمستقیم: ابتدا مقدار ۲۰ میکروگرم از توکسین در یک میلی‌لیتر بافر کربنات-بی کربنات (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 خشک کردن 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 خشک کردن میکروپلیت، از آنتی‌بادی ضد IgG 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 خشک کردن میکروپلیت، به تمامی

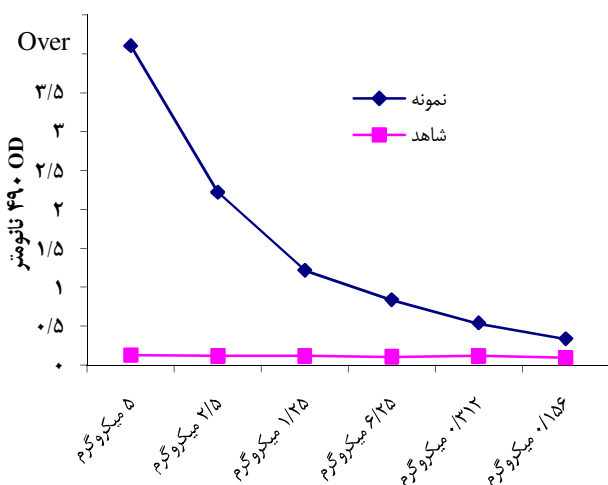
۰/۳۱۲ میکروگرم آنتی‌بادی تخلیص شده خرگوشی قادر به شناسایی توکسین بودند (نمودارهای ۴ و ۵).



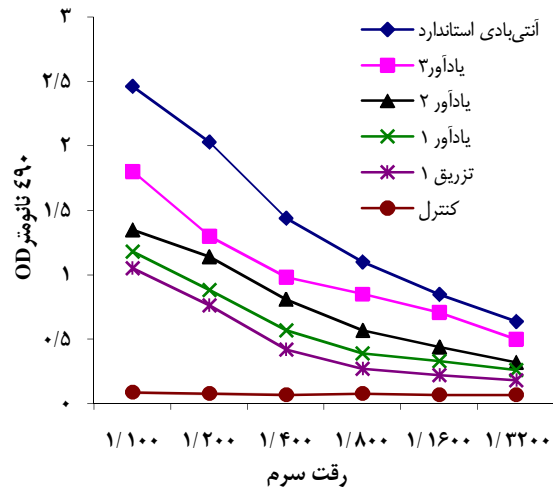
نمودار ۳) تیتراسیون سرم موش پس از هر بار تزریق



نمودار ۴) تیتراسیون آنتی‌بادی موشی پس از تخلیص سرم

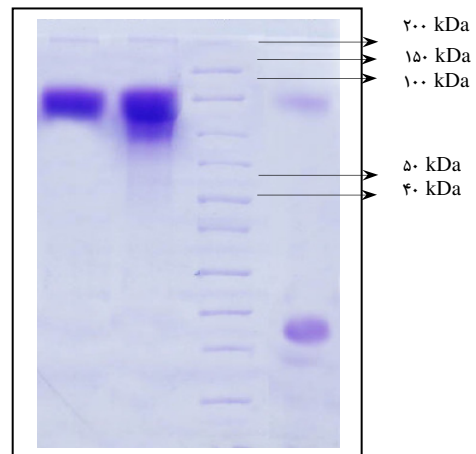


نمودار ۵) تیتراسیون آنتی‌بادی خرگوشی پس از تخلیص سرم



نمودار ۲) تیتراسیون سرم خرگوش پس از هر بار تزریق

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



شکل ۱) ژل SDS-PAGE سرم عبور داده شده از ستون G پروتئین- آنتی- بادی موجود در سرم خرگوش و موش به خوبی تخلیص شد و دارای یک باند مشخص با وزن تقریبی ۱۵۰ کیلو دالتون بود. آنتی‌بادی تخلیص شده سرم خرگوش در مجاورت 2ME شکسته شده و بخشی از آن یک باند با وزن تقریبی ۴۵ کیلو دالتون را نشان داد (ردیف ۱: سرم خرگوش عبور داده شده از ستون بدون 2ME؛ ردیف ۲: سرم موش عبور داده شده از ستون بدون 2ME؛ ردیف ۳: مارکر پروتئینی SM 0661 فرمتناز؛ ردیف ۴: سرم خرگوش عبور داده شده از ستون دارای 2ME)

نتایج روند تخلیص آنتی‌بادی از سرم موش و خرگوش با الکتروفورز و الایزای غیرمستقیم در شکل ۱ آمده است. آنتی توکسین به خوبی تخلیص شد و با توکسین خود به خوبی واکنش داد. کمتر از ۰/۱۵۶ میکروگرم آنتی‌بادی تخلیص شده موشی و کمتر از

اصلی به لحاظ ایمنوژنیسیته برابری و به نظر می‌رسد از سایر واکنش‌های بوتولینوم برتر باشند [۱۱].

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

یکی از روش‌های تولید توکسوئید، افزودن فرمالین تجارته (فرمالدئید ۳۷٪) به توکسین تخلیص شده 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 به مدت ۳ تا ۴ هفته نگهداری می‌شود. توکسین تیپ E برای تبدیل به توکسوئید به زمان کمتری نیاز دارد. برای اطمینان از غیرسمی شدن توکسین، توکسوئید حاصل به موش تزریق می‌شود. سپس با افزودن فسفات آلومینیوم به توکسوئید و نگهداری آن در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب، توکسوئید رسوب داده می‌شود. تیپ‌های A، B، C و E با غلظت ۰/۵٪ فسفات آلومینیوم رسوب می‌کنند، در حالی که مقدار ۱٪ فسفات آلومینیوم به تیپ D باید افزوده شود. در گزارش دیگری، برای تبدیل توکسین تخلیص شده 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 سمیت، 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 تخلیص شده افزوده و به مدت 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 تخلیص شده با ادجوانت ناقص فروند مخلوط می‌شود. در تمام موارد فوق، توکسین به‌صورت ناقص تخلیص شده است؛ ولی تولید آنتی توکسین علیه تیپ E کلاستریدیوم 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 علائم مسمومیت نشان ندادند و زنده ماندند. همچنین، از روش الایزای غیرمستقیم برای تعیین تیتراژ آنتی‌بادی استفاده شد. تکنیک الایزای، توسط انگ‌وال و پرل‌مان در سال ۱۹۷۱ توصیف شده است که بعداً تغییراتی در این روش داده شد. در سال ۱۹۷۹، اولین آزمایش

در این تحقیق، آنتی توکسین کلاستریدیوم بوتولینوم تیپ E تهیه شد. آنتی توکسین، در شناسایی جدایه‌های کلاستریدیوم 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 به دلیل 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 الایزای، بیشترین کاربرد را برای آنالیز غذاها داشته است. برای بهبود حساسیت سنجش، روش‌های تغییر یافته الایزای مطرح شده است که پیشرفته‌ترین آنها روش ساندویچ الایزای 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 تخلیص شده موشی و خرگوشی، علیه توکسین بوتولینوم تیپ E که برای آزمایش ساندویچ الایزای لازم است، تهیه شد.

تنها داروی در دسترس پس از آلودگی با توکسین بوتولینوم، استفاده از آنتی توکسین است. البته آنتی‌بادی‌تراپی علائم 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. آنتی توکسین 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 تیپ A، B، C، D و E سم‌زدایی شده 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 سروتیپ‌های 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 کیلر، 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 انجام شده در شیشه و در زیوه نشان داد که توکسوئیدهای جدید تقریباً با توکسین

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 botulinum and 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 more 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.

برای تعیین توکسین کلستریدیوم بوتولینوم تخلیص شده 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 الایزا 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 تیترو می‌شد. آنتی‌بادی استاندارد، از نوع اسبی و به‌طور اختصاصی علیه تیپ E بود.

نتیجه‌گیری

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

منابع

1- Arnon SS, Schechter 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.