مقاله مروری

طب‌نظامی
بهار ۱۳۸۷، شماره ۱۰ (۱)
صفحات: ۱۰-۱

روش‌های مختلف تشخیص توکسین‌ها

رضا رنجبر[۱] Ph.D.

آدرس مکاتبه : تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۷/۳/۱۹

خلاصه

مقدمه: توکسین‌ها مواد زیان‌آوری هستند که توسط ارگانیسم‌های زنده از جمله حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. در بین توکسین‌ها، توکسین بوتولینوم، انتروتوکسین B استافیلوکوکی و ریسین از جمله مهمترین توکسین‌هایی هستند که در اینجا مباحث تشخیصی آن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. تشخیص سریع توکسین‌ها اهمیت حیاتی در کاهش اثرات سوء ناشی از کاربرد این عوامل دارد.

در این مطالعه، با گرد آوری آخرین اطلاعات منتشر شده، مروری کلی بر روشهای تشخیصی توکسین‌های مهم صورت گرفته است. همچنین مزایا و معایب تکنیک‌های مورد استفاده نیز به تفصیل ارائه شده است.

نتیجه‌گیری: از بین روش‌های ذکر شده، الایزا، مس اسپکترومی و روشهای دیگر همچون انواع روش‌های مبتنی بر کروماتوگرافی جهت تشخیص توکسین‌ها بویژه ریسین، توکسین B استافیلوکوک و توکسین T۲ (تریکوتسن) کارایی مناسبی نشان داده‌اند چرا که حساسیت و ویژگی این روشها در حد قابل قبولی بوده و بعضا" قادرند بشکل همزمان چند توکسین را شناسایی نمایند.

واژه‌های کلیدی: توکسین، مایکوتوکسین، باکتریوتوکسین

مقدمه

توکسین‌ها مواد زیان آوری هستند که توسط موجودات زنده از جمله حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. این مواد در بعضی از خصوصیات از سموم صنعتی متمایز می‌باشند. در تولید آنها انسان دخالتی ندارد و به شکل کاملاً طبیعی ساخته می‌شوند. توکسین‌ها به بخار تبدیل نمی‌شوند و در شرایط معمولی روی پوست غیر فعال می‌باشند (بجز مایکوتوکسین‌ها) و قدرت سمیت آن‌ها نسبت به وزنشان بسیار زیاد است. بعضی از این عوامل مانند توکسین باکتری کلستریدیوم بوتولینوم از سمی‌ترین سموم شناخته شده در جهان می‌باشند به‌گونه‌ای که یک گرم از کریستال این توکسین در صورت پخش شدن و استنشاق، قدرت از بین بردن یک‌میلیون نفر را دارد [۱،۲].

توکسین‌های زیستی بخاطر قدرت سم‌زایی بسیار بالا و تولید نسبتاً ارزان و ساده همواره مورد توجه کشورهای مختلف جهت اهداف خصمانه بوده‌اند. در این راستا باکتریوتوکسین‌ها و مایکوتوکسین‌ها همواره مدنظر بوده و به اشکال گوناگون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. توکسین‌های قارچی بسیار زیادی شناخته شده‌اند که بعنوان مواد پرخطر زیستی به شمار می‌روند به عنوان مثال آفلاتوکسین و

۱- استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیة الله

تریکوتسن از توکسینهای مهم قارچی(مایکو توکسین) به شمار میروند. این مواد به طرق گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرند از جمله تولید آئروسل‌های آلوده به این عوامل و آلوده ساختن منابع آب و منابع غذایی [۳،۴].

با توجه به اهمیت و خطرات ناشی از این عوامل، تشخیص سریع آن‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است زیرا در غیاب تأمین تدارکات خاص در سطح محلی، منطقه‌ای و ملی یک حادثه زیستی ناشی از استفاده از این عوامل بعنوان آلوده کننده‌های آب و مواد غذایی، اساس بهداشت و درمان محلی و شاید ملی را به هم می‌ریزد و باعث وخیم‌تر شدن وضعیت بحران می‌گردد [۷-۵].

نگاهی کلی بر روش‌های سنجش توکسین‌ها

۱- روش‌های زیستی:

روش‌های تشخیصی پیشرفته، روش‌هایی سریع، آسان و دقیق می‌باشند ولی این روش‌ها بر خلاف روش‌های زیستی اطلاعاتی راجع به فعالیت زیستی توکسین‌ها فراهم نمی‌آورند، از اینرو روش‌های بیولوژیک هنوز هم امروزه جهت تشخیص بعضی از سموم بعنوان استاندارد طلایی مد نظر می‌باشند. این روش‌ها بیشتر بر پایه تزریق و بررسی فعالیت سموم در حیوانات مختلف آزمایشگاهی از جمله موش، میمون، خرگوش و یا خوکچه هندی می باشند. روش‌های مبتنی بر کشت سلولی و بررسی فعالیت توکسین در سلول‌ها نیز از روش‌های زیستی است که در مقیاس وسیعی مورد استفاده می‌باشد [۸].

۲- روش‌های ایمونولوژی:

این روش‌ها بسیار ساده‌تر و ارزانتر از روش‌های زیستی هستند و در مقیاس وسیعی مورد استفاده اکثر مراکز سنجش زیستی و نظامی قرار می‌گیرند. مهمترین این روش‌ها شامل موارد زیر است.

روش‌های انتشار در ژل

این روش‌ها یکی از اولین روش‌های ایمونولوژیک مورد استفاده و شامل انتشار یک طرفه، ۲ طرفه و روش‌های میکرو اسلاید می‌باشند. جهت انجام این آزمایش‌ها، فراهم کردن آنتی‌ژن در شکل رسوب جزء ضروری و مهم می‌باشد. از میان این روش‌ها، متد اوچترلونی از بقیه بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است. این تکنیک جهت شناسایی سموم مختلف از جمله سموم استافیلوکوکی کاربرد داشته است. این تکنیک حساسیت تشخیصی در حدود ۰/۱ تا ۰/۰۱ میکروگرم در میلی‌لیتر را در مورد سموم استافیلوکوکی دارد ولی از طرفی تفسیر نتایج آن مشکل می باشد. ایجاد واکنش‌های غیراختصاصی از دیگر مشکلات این تکنیک می‌باشد [۸].

سنجش به‌روش هماگلوتیناسیون

روش‌های مبتنی بر هماگلوتیناسیون به مراتب حساس‌تر از روش‌های سنجش انتشار در ژل می‌باشند. بر خلاف روشهای انتشار در ژل، نیازی به فرم قابل رسوب آنتی‌ژن نمی‌باشد. در هماگلوتیناسیون معکوس، اریتروسیت‌های پوشیده شده با توکسین به واکنش اضافه می‌گردد و در صورت آزاد بودن آنتی بادی‌ها، آگلوتیناسیون رخ می‌دهد. در آزمون آگلوتیناسیون معکوس، آنتی بادی با اریتروسیت‌های گوسفند متصل می‌گردد و هنگامی که توکسین موجود است، با آن آگلوتیناسیون ایجاد می کند [۹].

کواگلوتیناسیون

در این روش آنتی‌بادی علیه توکسین با پروتئین Aباکتری استافیلوکوکوس اورئوس باند می‌شود. پروتئین A به قسمت Fc آنتی بادی متصل شده و قسمت Fab آنتی‌بادی آزادانه در سطح پروتئین A عرضه می‌شود.

آگلوتیناسیون ذرات لاتکس غیر فعال و معکوس

این روش برای شناسایی آنتی‌ژن‌های محلول در عصاره‌های غذایی و یا کشت سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در روش‌های آگلوتیناسیون سنتی، آنتی‌بادی محلول با آنتی‌ژن واکنش میدهد اما در آگلوتیناسیون ذرات لاتکس غیر فعال و معکوس، آنتی‌بادی‌ها به ذرات لاتکس متصل می‌گردد و با آنتی‌ژن محلول واکنش می‌دهند. در این روش رقت‌های متوالی از نمونه تهیه شده و با مقدار ثابتی از آنتی بادی متصل شده به ذرات لاتکس سنجیده می‌شود [۹].

ایمونوالکتروفورز

این روش برپایهٔ واکنش آنتی‌بادیهای اختصاصی تولید شده علیه توکسین‌های مختلف می‌باشد. کاربردی‌ترین روشهای مبتنی بر این اساس، کانتر ایمونوالکتروفورز و راکت ایمونوالکتروفورز می‌باشند. این تکنیک‌ها روشهایی حساس جهت شناسایی توکسین‌های

مختلف از جمله توکسین‌های استافیلوکوکی، توکسین بوتولینوم و غیره می باشند [۹].

الایزا

(ELISA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

روش الایزا کمّی در سال ۱۹۷۱ توسط Van Wemen ابداع گردید. از آن تاریخ روش‌های سنجش ایمنولوژیکی بسیاری ابداع گردیده‌اند ولی بدون شک الایزا بهترین و بیشترین استفاده را در تمام دنیا داشته است.

در روش مستقیم یا دوگانه (Sandwich Format)، آنتی‌ژن هدف با انکوباسیون نمونه و اتصال به آنتی‌بادی متصل شده به چاهک‌ها سنجیده می‌شود. این آنتی‌ژن متصل شده با یک آنزیم دیگر که خود آن توسط یک آنتی بادی اختصاصی پوشیده شده است، اتصال می‌یابد و در صورت اتصال سوبسترای آنزیم که به واکنش اضافه می‌گردد، رنگ مخصوص و یا محصول فلورسنت تولید می‌کند که میزان رنگ یا فلورسنت تولید شده تابعی از میزان آنتی‌ژن ردیابی شده خواهد بود. الایزا یکی از روشهایی است که وسیع‌ترین استفاده را در بین اکثر روشهای تشخیصی ایمونولوژیکی دارد. مزایای این تکنیک از جمله حساسیت قابل قبول آن باعث شده تا مقبولیت بسیار زیادی را در تشخیص‌های مختلف کلینیکی و بیولوژی داشته باشد. این روش و روشهای ترکیبی آن از جمله PCR – ELISA در مورد تشخیص اکثر توکسین‌های باکتریایی، قارچی و غیره بکار رفته است و این تکنیک‌های ترکیبی، حساسیت و ویژگی بسیار بالایی نسبت به تکنیک‌های قدیمی دارند[۱۰،۱۱].

(ELIFA) Enzyme-Linked Immuno Filtration Assay

یکی از روش‌های سریع سنجش ایمنولوژیکی مشتق از الایزا، روش الایفا می‌باشد. گزارش شده است که این روش در بسیاری از موارد حساسیتی برابر و حتی بیشتر از روش الایزا دارد. در این روش یک غشای نیترو سلولز وجود دارد که بین چاهک‌ها و یک پمپ قرار می‌گیرد. فیلتراسیون نمونه از غشای مذکور واکنش بین واکنش دهنده‌ها و لیگاندهای آن‌ها که در غشای نیترو سلولز ثابت شده‌اند را تسریع می‌کند به‌گونه‌ای که آزمایش فوق از ۴ ساعت در مورد الایزا به یک ساعت در مورد الایفا کاهش یافته است [۱۱].

۳- روش‌های مبتنی برکروماتوگرافی

روش‌های مبتنی برکروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی گاز مایع (GLC) و یا کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)، جهت تشخیص توکسین‌های مختلف از جمله بوتولینوم، توکسین‌های استافیلوکوکوس اورئوس و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند. این تکنیک‌ها حساسیت بسیار بالایی داشته و به همین دلیل کاربردهای متعددی به عنوان یک ابزار تشخیصی مناسب پیدا نموده اند.

٤- روش فلوسیتومتری

روش‌های مبتنی بر فلوسیتومتری براساس اصول پراکندگی، برانگیختگی و انتشار نور استوار می‌باشند. به این شکل که برانگیختگی نور و انتشار مولکولهای فلوروکروم باعث ایجاد امواج دارای اطلاعات چندگانه از ذرات مورد سنجش، می‌گردد. این تکنیک در تشخیص توکسین B استافیلوکوک دارای حساسیتی در حدود یک پیکوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

٥- روش رادیوایمنواسی (RIA) Radio Immuno Assay

در این روش آنتی‌ژن با یک ماده رادیو اکتیو نشاندار شده و سپس با آنتی‌بادی اختصاصی خود واکنش می‌دهد. میزان اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی توسط تعیین میزان رادیو اکتیویته مشخص می‌شود. این روش از روش‌های سنتی و بخصوص انتشار در ژل بسیار حساس‌تر است ولی دارای معایبی است که شامل نیاز به تجهیزات مخصوص و خطر کار با مواد رادیواکتیو می‌باشد. این متد قادر است مقادیر ۱۰۰ پیکو مول از توکسین ریسین را در نمونه‌های بالینی تشخیص دهد [۹].

٦- روش پروب‌های اسید نوکلئیک و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

این روش‌ها، بسیار حساس و اختصاصی جهت سنجش و نیز تکثیر ژن‌های کد کننده توکسین‌های باکتریایی و قارچی‌میباشند. این روش‌ها در سطح بسیار وسیعی برای سنجش ژن‌های مسؤل در

تولید توکسین‌های زیستی مختلف بکار می‌روند.

لازم بذکر است که قبل از طراحی استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی جهت تشخیص انواع مسمومیت‌های باکتریایی قارچی یا عوامل دیگر، مهمترین عاملی که راهنمایی کننده جهت طراحی و استفاده از این تکنیک‌ها می‌باشد، علائم بالینی و تظاهرات خاص مسمومیت می‌باشند که در بعضی از موارد در بین عوامل مختلف مشترک می‌باشد ولی در بسیاری از موارد هم می‌تواند بسیار کمک کننده باشد [۱۲]. تأکید بیشتر این متن بر مرور تکنیک‌ها بوده و علائم بالینی به اختصار ذکر شده است. در ادامه به معرفی برخی روش‌های نوین تشخیص توکسین‌ها اشاره می شود و سپس به مهمترین توکسین‌ها و روشهای تشخیص آنها پرداخته می شود.

۷- روش‌های نوین تشخیص توکسین‌ها

امروزه آنتی‌بادی‌ها کاربرد وسیعی در تشخیص ایمنولوژیکی توکسین‌های مختلف دارند ولی از طرفی دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشند از جمله حساسیت آن‌ها به دما (در نتیجه دناتوره شدن ساختمان پروتئینی آن‌ها). این محدودیت‌ها باعث شده تا آنتی بادی‌ها با تکنولوژی‌های جدیدتر جایگزین گردند.

از جمله این روش‌ها می توان به استفاده از Aptamer chipها و یا استفاده از گلیکواسفنگولیپیدها (GSLs) اشاره نمود. گلیکواسفنگولیپیدها ارتباط بسیار محکم و قوی را با توکسین‌های (پروتئین) مختلف برقرار می‌کنند و حساسیت بسیار بالایی را نیز دارا می‌باشند لذا مزیت‌های زیادی نسبت به تکنولوژی آنتی‌بادی نشان داده‌اند. از روش‌های دیگر می‌توان به تکنیک‌های بهبود یافته بر اساس تکنولوژی Micro chip اشاره کرد. یکی از این متدها، روش Micro chip در ترکیب با ژل‌های مختلف است که تکنیکی بنام Protein gel-based Micro chip را بوجود آورده است. این تکنولوژی در سنجش‌های ایمنولوژیکی مختلف از جمله در ایمونواسی‌های بر پایه فلورسنت کمی لومینسانس و Mass spectromy مورد استفاده قرار گرفته است[۲۳،۳۲،۳۳].

یکی دیگر از روش‌های جایگزین در سنجش‌های بر پایه آنتی‌بادی، روشی بنام Solid phase Surface Immuno assay Technology است. این تکنیک دارای حساسیتی بسیار بالا و توانایی سنجش هم زمان چند توکسین از جمله ریسین، SEB و یا تریکوتسن می‌باشد. این متد، جایگزینی برای روش‌های قدیمی‌تر بر پایه Micro Plate مثل Magnetic Micro phore Gold coated magneto elastic sensor surface می‌باشد.

روش دیگری که در سنجش ریسین اخیراً ابداع شده به نام Im-munomagnetic Microsphere Surface می‌باشد. این‌روش شامل ۲ جزء کمی لومینسانس است یکی شامل فلوروژنیک کمی لومینسانس (FCL) و دیگری الکتروکمی لومیسانس (ECL) می‌باشد. این تکنیک قادر است که توکسین ریسین را در حد ۵ ٪ ml/pg ردیابی کند [۹،۱۵،۲۱].

Capillary Electrophoresis از تکنیک‌های دیگری است که جهت ردیابی ریسین کاربرد فراوانی یافته است. این روش در ترکیب با متدهای دیگر Capillary Electrophoresis-based Immuno Assay (CEIA) در سطح وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است.

توکسین‌های باکتریایی

انتروتوکسین B استافیلوکوکی (SEB)

استافیلو کوک اورئوس تولیدکننده تعدادی اگزوتوکسین مختلف می‌باشد که یکی از آنها انترو توکسین (SEB) B است. این توکسین دارای طیف وسیع فعالیت زیستی است. پس از گذشت ۳ تا ۱۲ ساعت از تماس استنشاقی توکسین، بطور ناگهانی تب، لرز، سر درد، میالژی و سرفه‌های بدون خلط بروز می‌کند. بدلیل دفع سریع این توکسین از جریان خون، تعیین حضور آن در جریان خون همزمان با بروز علایم مشکل است با اینحال توسط بعضی از تست‌های حساس آزمایشگاهی می‌توان آن را ردیابی کرد.

سابقاً روش‌های تشخیص سموم استافیلوکوکی از جمله انترو توکسین B مبتنی بر روش‌های انتشار در ژل بود که حدوداً ۵ تا ۱۱ روز زمان نیاز داشت. بعد از آن روش‌های مبتنی بر RIA بسیار حساس‌تر و مفیدتر از روش‌های گذشته جهت ردیابی این سم معرفی گردید [۱۳]. این روش‌ها ۱۰۰ برابر حساس‌تر از روش‌های انتشار در ژل می‌باشند. روش‌ها و کیت‌های تجاری مختلفی برای تشخیص سم SEBو دیگر سموم استافیلوکوکی موجود است که حساسیتی برابر و در بعضی موارد بیشتر از تکنیک‌های RIA دارند. این روش‌ها شامل متدهای RPLA می‌باشند. اساس این تکنیک‌ها همان تشخیص

ایمنولوژیکی مبتنی بر ذرات لاتکس است. علاوه بر موارد فوق تست‌های مبتنی بر الایزا قادر هستند سموم استافیلوکوکی را بسیار حساس‌تر از تکنیک‌های سنتی اندازه‌گیری کنند. این تکنیک‌ها توکسین را در مقادیر۲۵/. ng/ml تشخیص می‌دهند [۱۴].

امروزه علاوه بر روش‌های فوق، روش‌های بسیار جدیدتر و پیشرفته‌تری جهت ارزیابی SEB عرضه شده‌اند. با بکارگیری بیوسنسورها وترکیب آنها با تکنولوژی فلورسنت، تحولات بزرگی در تشخیص بیوتوکسین‌ها و مواد زیستی دیگر بوجود آمده است. تکنیک‌های array-based biosensor شامل ۲ پروب می‌باشند که امکان تشخیص همزمان چند ماده و در اندازه‌های بسیار کم را می‌دهند، پروب اول شاملImmobilized Capture Antibodies می‌باشند که توسط پروب دوم که در واقع شامل آنتی‌بادی‌های فلورسنت می‌باشد، شناسایی میشوند. این تکنیک‌ها در شناسایی SEB بهترین نتایج را در برداشته اند. از جمله تکنیک‌های دیگر، میکروچیپ‌های الکترونیکی (Electronic Microchips) قابل ذکر است که در واقع روش سنجش بر پایه میکرو الکتروفورز (Micro Electrophoresis) می‌باشد. این متد قابلیت ترکیب با روش‌های دیگر را نیز دارد. این روش نیز امکان آنالیز چند نمونه و چند سم را همزمان فراهم می‌آورد.

روشImmuno Magnetic Separation (IMS) از روش‌های جدید دیگری بوده که در واقع نوع پیشرفته‌ای از روش‌های ایمنواسی می‌باشد. در این روش از دانه‌های مغناطیسی بسیار کوچکی استفاده می‌شود که با آنتی‌بادی‌های اختصاصی پوشیده شده است [۹،۱۵]. این روش دارای حساسیت بسیار بالایی میباشد به گونه ای که SEB را در غلظت‌های ml/ng ۰/۱ بخوبی مشخص می‌کند.

روش FM-IMS یکی از روش‌های تکمیلی IMS است که در آن از Microplate Fluorometer استفاده می‌شود. این روش نسبت به IMS بسیار سریع‌تر بوده و در آن امکان سنجش توکسین حتی در نمونه‌های فرآوری نشده فراهم گردیده است. روش‌های جدید تشخیص SEB بسیار متنوع و گسترده می‌باشند که در ادامه به ذکر مهمترین آن‌ها اکتفا می‌گردد. مهمترین این روش‌ها شامل روش‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک شامل Real-Time PCR، ELISA-PCR، PCR و یا روشهای جدید تر مانند Magneto-plastic Sensors، Surface Plasmon Resonance، ELI-SA-LAPS، Fluorescent assay ، Fibroptic_Sandwich Immuno assay و Piezoelectric Crystal Immunosensor می‌باشند [۱۷-۱۵].

توکسین‌های کلستریدیوم پرفرنژنس

این توکسین‌ها توسط یک باکتری گرم مثبت بی‌هوازی بنام کلستریدیوم پرفرنژنس تولید میشوند. استفاده از برخی از این توکسین‌ها در عملیات خرابکارانه در منابع آب یا انبارهای موادغذایی دور از ذهن نیست [۱۸]. از انواع سموم این باکتری نوعA وC در انسانها عامل مسمومیت است که البته بیشتر موارد در اثر مسمومیت با نوع A می‌باشند. تشخیص کلستریدیوم و سموم آن در مواد غذایی معمول نیست و اکثر اوقات تشخیص آن بر مبنای جستجوی سم در مدفوع می‌باشد. متدهای مختلفی برای شناسایی سموم کلستریدیوم پرفرنژنس گزارش شده اند. از بین این روش‌ها تنها روش کشت سلولی Vero دارای حساسیت و ویژگی بالایی است.

تست‌های ایمنولوژیک متعددی نیزجهت تشخیص این توکسین وجود دارند. همچنان که در مورد SEB گفته شد ، روش‌های قدیمی‌تر مثل روش‌های انتشار در ژل، RPLA و ELISA بخوبی در تشخیص سموم کلستریدیوم پرفرنژنس مورد استفاده قرار می‌گیرند.

تست‌های مبتنی بر ELISA با حساسیت در حدml/ng ۲-۱ قادر به تشخیص سموم این باکتری می‌باشند. روش‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک در مورد تشخیص این باکتری و ژن‌های عامل مسمومیت آن بخوبی توسعه یافته‌اند. از جمله تست‌های مبتنی بر PCR و پروب‌های مولکولی شامل روش‌های هیبریدیزاسیون و یا انواع روشهای تکثیری جهت ژن‌های دخیل در ایجاد توکسین‌های باکتریایی میباشند. استفاده از بیوسنسورها و تکنیک‌های مبتنی بر فلورسنت در مورد سموم کلستریدیوم دیفیسیل نیز باعث ایجاد روش‌های سنجش بسیار دقیق و سریع شده است [۱۹].

از روش‌های مفیدی که جهت ارزیابی و سنجش توکسین کلستریدیوم پرفرنژنس بکار می‌روند میتوان به روش‌هایPoly Capture ELISA(PC-ELISA)، Mouse Neutralization Test (MNT) و کانتر ایمونوالکتروفورز اشاره نمود. این تکنیک‌ها همگی روش‌هایی با حساسیت و ویژگی بالا جهت شناسایی توکسین‌های

کلستریدیوم پرفرنژنس ارزیابی شده‌اند [۲۰].

توکسین کلستریدیوم بوتولینوم

این توکسین توسط باکتری بی‌هوازی کلستریدیوم بوتولینوم تولید می‌شود. شروع بیماری با فلج اعصاب‌مغزی همراه بوده است که شامل تاری دید، دو بینی، خشکی دهان و حلق و دیسفاژی می‌باشد. تظاهرات بیماری خیلی زود طی ۱۲ تا ۳۶ ساعت پس از استنشاق توکسین شروع می‌شود.

روش‌های تشخیص سنتی مثل روش‌های مبتنی بر تزریق به حیوانات آزمایشگاهی جهت تشخیص توکسین و مسمومیت‌های این باکتری استفاده می‌شوند ولی این روش‌ها از ویژگی‌بالایی برخوردار نیستند. توکسین این باکتری‌معمولاً در نمونه‌های مدفوع، غذا یا خون اندازه‌گیری می‌شود. در بین این روش‌ها، روش تزریق به موش از حساسیت بالایی برخوردار است ولی مشکلات زیادی به همراه دارد از جمله مقرون به صرفه نبودن، نیاز به تجهیزات خاص و دسترس نبودن حیوانات آزمایشگاهی. روش‌های الایزا با استفاده از آنتی‌بای‌های منوکلونال و پلی‌کلونال روش‌های جایگزینی برای تست‌های سنتی تشخیص توکسین‌می‌باشند. روش‌های مولکولی مختلف جهت تشخیص توکسین‌های بوتولیسم طراحی و مورد استفاده قرارگرفته اند. بعنوان مثال این آزمایشات جهت تشخیص توکسین نوع B بوتولینوم در سطح وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است. تست‌های فوق برای نمونه‌های مختلفی از جمله سرم، خون، آسپیراسیون سیستم گوارش و مدفوع طراحی شده‌اند.

تست‌های مختلف الکترو میوگرام از روشهایی هستند که جهت تشخیص مسمومیت با این باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. از روش‌های جدیدی که اخیراً جهت تشخیص و شناسایی توکسین بوتولیسم استفاده می‌شوند می‌توان به الکتروکمی لومینسانس (ECL) اشاره کرد. این روش برپایه مولکول‌های آنتی‌بادی مونوکلونال طراحی شده است و روشی ساده و بسیار حساس با حساسیتی در حدود ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از روش‌های روتین مثل Chromogenic ELISA می باشد.

امروزه استفاده از لیگاندهای جدید که بر پایه اتصال به توکسین و بر اساس آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تهیه شده‌اند این امکان را فراهم کرده است که توکسین بوتولینوم را در حد فیتوگرم تشخیص دهند. این تکنولوژی تا میزان ۱۵۰ فیتوگرم، سم را براحتی تشخیص می‌دهد.

متد array Color–Coded bead یکی از تکنیک‌های جدید برای تشخیص سم بوتولینوم است. این تکنیک بر اساس فلوسیتومتری طراحی شده است، حساسیت این تکنیک از ELISA بیشتر بوده و هم‌اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۱،۲۲].

Mass Spectromy از دیگر تکنیک‌هایی است که جهت سم بوتولینوم بکارگرفته شده است و تکنیکی سریع برای تشخیص این توکسین می‌باشد. این تکنیک دارای معایبی نیز می‌باشد که از جمله می‌توان به تهیه دشوار نمونه‌های مورد استفاده و وجود مهارکننده‌ها اشاره کرد. از مزایای این تکنیک، سریع بودن و آنالیز همزمان چندین نمونه است. نیاز به دستگاه‌های پیشرفته و نیز هزینه بالا از دیگر محدودیت‌های این تکنیک می‌باشد.

ایمونو PCR که در واقع ترکیبی از بکارگیری آنتی‌بادی‌ها و تکنیک PCR است، هم اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرد و تکنیکی سریع و با قدرتی بالا نشان داده است ولی به‌علت محدودیت‌های آن از جمله مشکلات زمینه ای تکنیکی (Back ground Problems)، استفاده از آن کاملاً محدود باقیمانده است.

از تکنیک‌های دیگر میتوان به تکنیک‌های FRET (روش‌های مبتنی بر Fluorescence Resonance Energy Transfer) اشاره کرد. این تکنیک‌ها هم‌اکنون در حال پیشرفت می‌باشند و ممکن است در آینده کاربردهای وسیعی در تشخیص مسمومیت‌های ناشی از توکسین‌های باکتریال داشته باشند [۲۳].

توکسین تتانوس

این توکسین توسط کلستریدیوم تتانی تولید می‌شود و محل اصلی تأثیر آن سیستم‌عصبی است. انتقال جریان عصبی تحت تأثیر این توکسین مختل می‌شود و مهم‌ترین اثر آن مهار نورون‌های نخاعی می‌باشد که منجر به اسپاسم‌های عضلانی سیستمیک و تشنج و صرع می‌شود.

تشخیص این سم بر اساس علایم و معاینات بالینی و نیز استفاده از الکترومیوگرافی است. مهمترین مسأله در تشخیص سم این باکتری تشخیص افتراقی مسمومیت با استریکینین است. یکی از روشهای جدیدی که برای تشخیص توکسین تتانوس ابداع شده است، روش

آرایه‌های مونوساکارید Monosaccharide arrays می‌باشد. در این تکنیک از آرایه‌های کربوهیدراتی N استیل گالاکتوزامین و N استیل نورآمینیک اسید استفاده می‌شود. این آرایه‌ها در سطح یک تراشه (chip) ثابت شده و در واقع به عنوان گیرنده برای توکسین عمل می‌کنند. پس از اتصال، این مجموعه‌ها توسط پروب‌های فلور سنت شناسایی می‌شوند. این تکنیک پیشرفته جهت شناسایی توکسین‌های تتانوس و کلرا کارایی خوبی نشان داده است [۲۴،۲۵].

توکسین‌های قارچی

مایکوتوکسین‌ها یا توکسین‌های قارچی یک گروه حاوی بیش از ۴۰ ترکیب می‌باشند. این توکسین‌ها از طرق گوناگون باعث آلودگی انسان‌ها می‌شوند مانند آلودگی از طریق ایجاد آئروسل‌های آلوده و استنشاق، آلودگی موادغذایی، محیط و غیره. در سناریوی جنگ زیستی، باران زرد یادآور استفاده از توکسین‌های قارچی است که باعث آلودگی شدید محیط زندگی می‌شود.

تریکوتسن‌ها

این خانواده شامل ترکیباتی متعدد در حدود ۶۰ توکسین می‌باشد که توسط قارچ‌های Phomopsis، Fusarium و Stachybotrys تولید می‌شوند. تریکوتسن‌ها توکسینهایی هستند که از طریق پوست نیز جذب و موجب مسمومیت افراد می‌گردند. علایم درگیری سیستم تنفسی شامل درد قفسه سینه و هموپتزی است و در موارد آلودگی و مسمومیت شدید باعث ضعف شدید، شوک و مرگ می‌گردند. همچنین این توکسین‌ها به دنبال جذب چشمی و یا گوارشی سبب ایجاد مسمومیت و ایجاد علایم می‌گردند. این توکسین‌ها بشدت پروتئین سازی سلول‌های یوکاریوت را مهار می‌کنند و باعث مرگ سلول می‌شوند. تریکوتسن‌ها این عمل را از طریق مهار پپتیدیل ترانسفراز انجام می‌دهند. با استفاده از روش‌های گازکروماتوگرافی و HPLC می‌توان وجود توکسین را در پلاسما و ادرار بیمار تعیین نمود. ادرار نمونه مناسبی جهت تشخیص تریکوتسن می‌باشد. تریکوتسن سمی بسیار مهلک است که پس از تماس با آن حتی در حد چند میلی‌گرم می‌تواند کشنده باشد [۲۳،۲۶].

آفلاتوکسین

این توکسین بر اساس خصوصیات فلورسنت به ۴ گروه تقسیم می‌شود و یکی از قویترین توکسین‌های طبیعی است که خواص کارسینوژنی آن اثبات شده است. این توکسین توسط بسیاری از سویه‌های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شود. این توکسین یکی از مهمترین عوامل توکسینی است که می‌تواند در جنگ‌های زیستی بکار رود چرا که القای سرطان‌های مختلف و بدخیمی‌های کبد می‌تواند یکی از کشنده‌ترین عوامل برای از پا درآوردن بلند مدت نیروهای مقابل باشد. اثرات آفلاتوکسین‌ها بر خلاف تریکوتسن‌ها بلند مدت است [۳۰-۲۷].

با توجه به اهمیت فوق‌العاده و استفاده از عوامل قارچی و توکسین‌های مربوط به آنها در جنگ‌های زیستی و همچنین خطرات ناشی از آن‌ها، تشخیص و افتراق بموقع و سریع آنها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر روش‌های قدیمی، استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و پلی کلونال مسیرهای جدیدی را جهت تشخیص مسمومیت‌های قارچی باز کرده است. این تست‌ها غالباً بر روی نمونه‌های سرمی و یا ادرار انجام می‌شوند و نتایج نسبتاً قابل قبولی ارائه می‌کنند [۲۶]. در این روش‌ها می‌توان تشخیص‌های سرولوژیک را بسیار ارتقاء بخشید چرا که آنتی‌بادی‌های نوترکیب، آنتی‌بادی‌هایی با ویژگی و حساسیت بالا و در ضمن با هزینه پائین جهت تشخیص توکسینهای قارچی مختلف می‌باشند [۳۱].

توکسین ریسین

ریسین یک توکسین پروتئینی و خطرناک می‌باشد. این توکسین از گیاه کرچک بدست می‌آید که در تمام دنیا وجود داشته و براحتی از این گیاه قابل استخراج است. علائم مسمومیت با این توکسین شامل : تب، سرفه، دیسپنه، نکروز راه‌های هوایی و مویرگ‌های ریوی، دیسترس تنفسی شدید و در نهایت مرگ می‌باشد. برای تشخیص مسمومیت با این توکسین می‌توان از تست الایزا در خون و یا تست‌های ایمنوهیستوشیمی در نسوج استفاده کرد. رادیو ایمونواسی یکی از قدیمی‌ترین روش‌هایی است که جهت تشخیص این توکسین بکار گرفته می‌شود. این متد قدرت تشخیص تا ۱۰۰ پیکوگرم از توکسین را دارد. این تست گرچه قدرت تشخیص و حساسیت بالایی دارد ولی در مقابل مشکلاتی نیز دارد که باعث شده است متدهای دیگر از جمله الایزا بیشتر مورد استفاده قرار گیرند. از جمله مشکلات آن استفاده ازمواد رادیواکتیو و انکوباسیون طولانی مدت می باشد. در مقابل، ELISA مدت زمان کوتاهتری را بخود

اختصاص داده و نسبت به RIA تست بسیار سریع‌تری می‌باشد. اخیراً استفاده از Planar array Immunosensor جهت شناسایی همزمان چندین توکسین از جمله ریسن، توکسین B استافیلوکوک و یرسینیا پستیس گزارش شده است. این تکنیک قادر به شناسایی توکسین ریسین در حد ۱۵ نانوگرم در میلی لیتر است. یکی از مزایای استفاده از این تکنیک حساسیت، سادگی و نیز قابل انجام بودن آن در مقادیر کم نمونه‌های بالینی می‌باشد. این تکنیک همچنین جهت شناسایی دیگر توکسینها نیز توسعه یافته است که شامل ریسین، SEB، توکسین وبا ، توکسوئید بوتولیسم و مایکوتوکسین فومونیسین می‌باشد [۳۴-۳۲].

اخیرا تکنیکهای جدیدی برای تشخیص ریسین عرضه شده اند که با دقت بسیار بالایی قادر به شناسائی این توکسین می‌باشند. این تکنیکها غالبا روشهای electrochemiluminescence-based technology نامیده می‌شوند. البته استفاده از اینها هنوز عمومیت نیافته است [۳۵].

نتیجه‌گیری

توکسینها به عنوان عوامل زیستی شناخته شده‌اند که در مقادیر بسیار کم می‌توانند برای موجودات زنده شامل انسانها و حیوانات خطرناک و اغلب کشنده باشند. از این رو همانطور که گفته شد در اپیدمی‌های مختلف باکتریایی و یا حملات زیستی توسط عوامل مولد توکسین و یا استفاده مستقیم این مواد، تشخیص به موقع و واکنش سریع علیه این عوامل بسیار حائز اهمیت می‌باشد چرا که از دست دادن زمان می‌تواند به صدمات جبران ناپذیری برای سلامت و حیات انسانهای مورد حمله منجر گردد. به ویژه پس از حملات بیوتروریستی در امریکا، اهمیت تشخیص سریع این عوامل بیش از پیش اهمیت یافته است [۳۶].

از بین تکنیکهای موجود، تکنیک‌های زیستی (مثل روشهای تزریق توکسین به حیوانات آزمایشگاهی) می‌توانند علاوه بر مشخص‌نمودن وجود توکسین در نمونه، اثرات زیستی سم را نیز بررسی نمایند. امروزه با استفاده از تکنیک‌های جدیدتر همچون استفاده از روشهای الایزا، انواع روشهای مبتنی بر استفاده از پروب‌های مولکولی، انواع روشهای مبتنی بر کروماتوگرافی و فلوسیتومتری می‌توان در مدت‌زمان کوتاهی با حساسیتی بسیار بالا، وجود توکسین را در نمونه‌های مختلف بررسی نمود. از بین تکنیک‌های موجود الایزا و روشهای متنوع و ترکیبی مبتنی بر الایزا بیشترین کاربرد را در تشخیص توکسین‌های مختلف دارند. این تکنیک قادر است مقادیر ۰/۱ تا ۰/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر از توکسین‌های مختلف را تشخیص دهد درحالی که تکنیک‌های قدیمی همچون روشهای انتشار در ژل در حد ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر را تشخیص می‌دهند. روشهای جدیدتر همچون روشهای مبتنی بر کروماتوگرافی مثل LC-MS مقادیر حدود ۳ پیکومول را مشخص می‌کنند. همچنین با تست ELISA-PCR می‌توان در حد ۱ پیکوگرم توکسین را شناسایی نمود در حالی که آنتی‌بادیهای مونوکلونال دارای حساسیت تشخیصی در حدود ۳۰ نانوگرم در میلی لیتر می‌باشند. روشهای جدید دارای حساسیت بسیار بالایی می‌باشند ولی با توجه به زمانبر بودن و نیز هزینه‌های بالای مربوط به راه اندازی آزمایش و تجهیزات گرانبهای آنها می‌توان گفت آزمایشات مبتنی بر الایزا و روشهای برگرفته از آن مانند ELISA- PCR بهترین انتخابها می‌باشند.

منابع

1-Robbins AC, Swenson L, Nealley ML, Gots RE, Kelman BJ. Health Effects of Mycotoxins in Indoor Air. App Occup E Hyg 2000;15: 773–4.

2- Franz DR, Jahrling PB, Friedlander AM. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. JAMA 1997;278: 399-411.

3- Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG. Anthrax as a biological weapon: medical and public health man-agement. JAMA 1999;281:1735-45.

4- Henderson DA, Inglesby TV, Bartlett JG. Smallpox as a biological weapon: medical and public health man agement. JAMA 1999; 281:2127-2137.

5- Robert A, Richard M. Biological and chemical terrorism: strategic plan for preparedness and response: recommendations of the CDC Strategic Planning

Workgroup. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2000; 49:1-14.

6- Tucker JB. Toxic Terror: Assessing the Terrorist Use of Chemical and Biological Weapons. Cam-bridge, Mass. MIT Press 2000; 278:433-435.

7- Zilinskas RA. Iraq's biological weapons: the past as future? JAMA 1997; 278:418-424.

8- Ouchterlony O. Antigen antibody reactions in gels. Path Microbiol Sci 1949; 25:507-15.

9- Siok Ghee Ler A , Fook KL , Gopalakrishnakone P. Trends in detection of warfare agents Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin. J Chromatogr 2006; 1133:1–12.

10- Gill MD. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. Microbiol Rev 1982; 46:86-94.

11- Park CE, Akhtar M, Rayman MK. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl Environ Microbiol 1992; 58:2509-12.

12- Reischl U. Application of molecular biology-based methods to the diagnosis of infectious diseases. Frontiers Biosci 1996; 1: 72–77.

13- Bergdol MS. Detection of the staphylococcal toxins. Adv Exp Med Biol 1996; 391: 465-79.

14- Lovseth A, Loncarevic S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. J Clin Microbiol 2004; 85: 3869–72.

15- Shahzi S, Iqbal D, Michael W, Mayo A, Bruno JG, Bronk BV. A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. Bios Bioel 2000; 15: 549–78.

16- Stevens P, Alam S, Young LS, Chesebro K. Sensitive measurement of endotoxin by radio-rocket immunoelectrophoresis using Staphylococcus aureus protein A. J Immunol Methods 1981;43:199-207.

17- Meunier O, Falkenrodt A, Monteil H, Colin DA. Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from Staphylococcus aureus. Cytometry 1995; 21:241-7.

18- Niilo L. Clostridium perfringens in animal disease: a review of current knowledge. Can Vet J 1980; 21:141–8.

19- Hornitzky MAZ, Romalis LF, Ross AD, Sheldrake RF. Comparison of counterimmunoelectrophoresis with mouse protection assay in the detection of epsilon toxin in the intestinal contents of goats. Aust Vet J 1989; 66:121–2.

20- Weddell W, Worthington RW. An enzyme labelled im-munosorbent assay for measuring Clostridium perfringens ep-silon toxin in gut contents. NZ Vet J 1984; 33:36–7.

21- Pimbley DW, Petel PD. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. J App Microbiol 1998; 84:98-109.

22- Cai S, Singh BR. Strategies to design inhibitors of Clostridium botulinum neurotoxins. Infect Disord Drug Targets 2007; 7:47-57.

23- Black RM, Clarke RJ, Read RW. Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. J Chromatogr 1986; 367: 103–9

24- Miriam M, Ngundi A, Chris R. Taitt A, Scott A. McMurry B , Daniel KC. Detection of bacterial toxins

with monosaccharide arrays. Biosen Bioelec 2006; 21: 1195–1201

25- Sterne M, Batty I. Pathogenic Clostridia. 1st ed. Butherworths, London. 1975, p. 144.

26- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rew 2003; 35: 497–516

27- Okumura T.Chemical and Biological Terrorism and Its Impact on Children: A Subject Review. Pediatrics 2000; 105; 662-70.

28- Danzig R, Berkowsky PB. Why should we be concerned about biological warfare? JAMA 1997; 278:431– 2.

29- Simon JD. Biological terrorism: preparing to meet the threat. JAMA 1997; 278:428 –30.

30- Sharp TW, Breenan RJ, Keim M, Williams RJ, Eitzen E, Lillibridge S. Medical preparedness for a terrorist incident involving chemical or biological agents during the 1996 Atlant Olympic Games. Ann Emerg Med 1998; 32:214 –23.

31- Karlesson RM, Michelson A, Mattson LJ. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. Immunol. Methods 1991; 145: 229-40.

32- Griffiths GD, Newman HV, Gee DJ. Immunocytochemical detection of ricin. Further studies using the immunoperoxidase method. J Histochem 1986; 14:25-9.

33- Garber EA, O'Brien TW.Detection of ricin in food using electrochemiluminescence-based technology. J AOAC Int. 2008 Mar-Apr;91(2):376-82.

34- Thirumala DK, Mayo MA, Reddy G, Reddy SV, Reddy DV. Recent Advances in Mycotoxin Diagnostics. An Prad India 2000; 12:35-9.

35- Garber EA, O'Brien TW. Detection of ricin in food using electrochemiluminescence-based technology. J AOAC Int 2008 91:376-82.

36- Kman NE, Nelson RN. Infectious agents of bioterrorism: a review for emergency physicians. Emerg Med Clin North Am 2008; 26:517-47.