Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.42; No.2; 2018

Production of IgY Antibody against Vibrio cholerae cytotoxin B and Development of an ELISA for Detection of Cholera Toxin

Mahdie Bayat[1], Alireza Khabiri[*2], Behzad Hemati[1]

1. *Microbiology Department of Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran*
2. *Diagnostic Biotechnology Unit, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran*

(Received: 2017/12/23 Accept: 2018/01/13)

Abstract

Background: *Considering the importance of rapid detection of cholera toxin in environmental samples, an immunoassay method was developed for direct detection of cytotoxin B.*

Materials and Methods: *The gene sequence of ctxB was cloned to pET28a vector and the recombinant protein was expressed in BL21 (DE3). The recombinant CtxB was purified via affinity chromatography and then used for immunization of chickens. The polyclonal anti-CtxB antibodies were purified from egg yolks using polyethylene glycol. The IgY antibodies were used to develop a sandwich ELISA. Also, analytical sensitivity of the assay was determined.*

Results: *A total of 38 mg of recombinant CtxB, more than %95 purity, was purified from 1 liter of bacterial culture. The titer of anti-CtxB antibodies in the serum sample of immunized chicken was 1:32,000. The yield of purified IgY was 50.9 mg per egg yolk. The detection limit of the developed ELISA was about 33 pg/ml of recombinant CtxB.*

Conclusion: *Management and control of Vibrio cholerae infection requires the availability of rapid diagnostic tools. The newly developed immunoassay provides a rapid and sensitive method for the detection of cytotoxin B of V. cholerae. We plan to evaluate the performance of the developed assay in the detection of cholera toxin in environmental and food samples in the following studies.*

Keywords: *Vibrio Cholerae; Cholera Toxin b Subunit; Immunoglobulin Y; Immunoassay*

**Corresponding author: Alireza Khabiri*
Email:akhabiri597@yahoo.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۷، صفحات ۷۱ تا ۷۸

تولید آنتی‌بادی مرغی ضد زیر واحد B توکسین ویبریوکلرا و راه‌اندازی روش الایزا برای تشخیص سم ویبریوکلرا

مهدیه بیات[۱]، علیرضا خبیری[۲*]، بهزاد همتی[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدکرج، ایران
۲- بخش فرآورده‌های تشخیصی انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

چکیده:

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت تشخیص سریع سم ویبریوکلرا در نمونه‌هایی مانند آب یا غذا، در این مطالعه به طراحی و راه‌اندازی یک روش ایمنواسی برای شناسایی مستقیم سیتوتوکسین *B* این باکتری، با استفاده از آنتی‌بادی مرغی لقدام شده است.

مواد و روش‌ها: توالی ژنی *ctxB* در وکتور بیانی *pET28a* کلون شده و سپس در باکتری *BL21 (DE3)* بیان شد. پروتئین‌های نوترکیب حاصله پس از تخلیص با روش ایمنوکروماتوگرافی، به‌صورت درون ماهیچه‌ای به مرغ تزریق و آنتی‌بادی پلی کلونال ضد پروتئین *CtxB* با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول از زرده تخم‌مرغ تخلیص شدند. این آنتی‌بادی‌ها برای طراحی یک روش الایزای ساندویچ استفاده شدند. حساسیت آنالیتیک روش طراحی‌شده با استفاده از رقت‌های سریالی پروتئین *CtxB* نوترکیب ارزیابی شد.

یافته‌ها: در ازای هر لیتر کشت باکتری *BL21 (DE3)* حاوی پلاسمید دربرگیرنده ژن *ctxB*، ۳۸ میلی گرم پروتئین نوترکیب با خلوص بیش از ۹۵ درصد تولید شد. تیتر آنتی‌بادی ضد *CtxB* در خون مرغ ایمونیزه برابر با یک به ۳۲/۰۰۰ بود و میزان ۵۰/۹ میلی گرم آنتی‌بادی مرغی از هر تخم‌مرغ خالص شد. روش الایزای طراحی‌شده با این آنتی‌بادی امکان تشخیص *CtxB* را تا غلظت ۳۳ پیکوگرم بر میلی‌لیتر فراهم کرد.

نتیجه‌گیری: آنتی‌بادی‌های مرغی ضد *CtxB* تولیدشده در این مطالعه، امکان ایجاد یک روش ایمنواسی را فراهم کردند که با آن تشخیص سریع و با حساسیت بالای سیتوتوکسین *B* فراهم می‌شود. ضروری است در آینده کارآیی این روش برای تشخیص سم ویبریو در نمونه‌های محیطی مانند آب یا مواد غذایی بررسی شود.

واژگان کلیدی: ویبریوکلرا، سیتوتوکسین *B*، ایمنوگلوبولین *Y*، ایمنواسی

مقدمه:

وبا بیماری عفونی و ویژگی اصلی آن اسهال آبکی و استفراغ در انسان است. عامل این بیماری باکتری گرم منفی کاما شکل و بی‌هوازی اختیاری ویبریوکلرا است(۱). این باکتری دارای سویه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زاست و سویه‌های تولیدکننده سم کلرا، عامل ایجاد پاندمی‌های وبا هستند(۲). در بسیاری از نقاط دنیا سروگروه‌های O باکتری با ایجاد اسهال ارتباط دارند(۳). ژنوم سویه‌های بیماری‌زای ویبریوکلرا پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم در ایجاد بیماری نقش دارند. حضور سم کلرا (CT[1])، جزایر پاتوژنیسیته و پیلی تنظیم‌شونده با توکسین[2] در سروگروه‌های O1 ویبریوکلرا، عواملی هستند که موجب بیماری‌زایی بیشتر این سویه‌ها نسبت به سویه‌های غیر O1 می‌شوند(۴).

روش استاندارد طلایی برای تشخیص این عفونت که مبتنی بر جداسازی و شناسایی عامل باکتریایی است، بسیار پیچیده، وقت‌گیر و هزینه‌بر است. از سوی

1 Cholera Toxin
2 Toxin co-regulated pillus

نویسنده مسئول: علیرضا خبیری
پست الکترونیک: *khabiri@pasteur.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]

دیگر، کشت باکتری این مزیت را دارد که به‌واسطه جداسازی باکتری، امکان تعیین هویت بیشتر عامل بیماری‌زا را فراهم می‌آورد. همچنین به‌کارگیری تست‌های تشخیصی سریع مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، الایزا، آگلوتیناسیون و ایمنوکروماتوگرافی، تشخیص سریع این باکتری را فراهم می‌کنند. تشخیص سریع عامل بیماری در مراحل اولیه اپیدمی، امکان مدیریت به‌موقع و جلوگیری از انتشار بیماری و همه‌گیری را فراهم می‌کند(۵).

در مورد بیماری وبا ضروری است همزمان با تشخیص باکتری یا پس از آن، قابلیت تولید توکسین توسط باکتری جداسازی‌شده بررسی و اثبات شود زیرا تنها باکتری‌های ویبریوکلرای سمزا عامل ایجاد علائم مربوط به وبا و ایجاد اسهال آب‌برنجی هستند. از سوی دیگر با وجود آنکه وبا با خوردن آب و غذای آلوده به ارگانیسم ایجاد می‌شود اما تشخیص حضور توکسین وبا در مواد غذایی یا نمونه‌های بالینی، به‌عنوان شاخصه اصلی بیماری‌زایی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای تشخیص توکسین وبا وجود دارند که از میان آن‌ها می‌توان به روش‌های بیواسی مانند لوپ روده‌ای، تست پوستی خرگوش و تست با سلول‌های CHO، روش‌های ایمنواسی شامل الایزا و آگلوتیناسیون و روش‌های مبتنی بر DNA مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و هیبریداسیون اشاره کرد(۶،۱۰). با آن‌که تست‌های مبتنی بر DNA نسبت به ایمنواسی حساسیت بالاتری دارند اما روش‌های ایمنواسی از مزایای مهمی در تشخیص توکسین خارج سلولی باکتری برخوردار هستند که می‌توان به هزینه کمتر، سادگی و سرعت بالاتر اشاره کرد.

کلرا توکسین توسط فاژ CTXϕ تولید می‌شود. ژنوم این فاژ شامل ده ژن است که تمامی این ژن‌ها به‌جز ctxA و ctxB، برای همانندسازی، اینتگراسیون، ترشح و بسته‌بندی فاژ حیاتی هستند. پروتئین‌های CtxA و CtxB در چرخه زندگی فاژ نقش ضروری نداشته و کدکننده توکسین هستند. فاژهای CTXϕ موجود در سویه‌های کلاسیک و التور از لحاظ توالی ژن rstR[3] به طورکامل متفاوتند اما در سایر ژن‌های این فاژ تنها پلی‌مرفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی مشاهده شده است(۱۱). در ارزیابی‌هایی که در زمینه اختصاصی بودن این بیومارکر برای تشخیص سویه‌های سمزا انجام شده، مناسب‌بودن آنتی‌بادی ضد CtxB تایید شده است(۶، ۸).

با توجه به اهمیت تشخیص توکسین وبا در نمونه‌های محیطی مانند آب و غذا و همچنین نمونه‌های بالینی مانند مدفوع و استفراغ، در مطالعه حاضر، اقدام به تولید آنتی‌بادی‌های مرغی اختصاصی علیه سیتوتوکسین B ویبریوکلرا شد تا توسط آن با بهره‌گیری از ویژگی‌های منحصربه‌فرد این نوع آنتی‌بادی، امکان راه‌اندازی یک روش ایمنواسی حساس و اختصاصی برای تشخیص سم وبا فراهم شود.

مواد و روش‌ها:

سویه‌های باکتریایی

سویه‌های باکتریایی استفاده شده در این مطالعه از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران و کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران که مربوط به سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران (IROST) است، تهیه شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر ژن ctxB

ویبریو کلرا سویه O1 (ایناوا) (PTCC No: ۱۶۱۱) روی محیط جامد LB آگار، در شرایط استریل، کشت داده شد. DNA باکتری با استفاده از کیت GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies, Malaysia) و مطابق دستورالعمل سازنده تخلیص شد. پرایمرهای اختصاصی ژن ctxB بر اساس توالی این ژن با شماره دسترسی X00171 در بانک ژنی، طراحی و با توجه به استراتژی کلونینگ مورد نظر، سایت‌های برش BamHI (در پرایمر مستقیم) و XhoI (در پرایمر معکوس) (حروف کوچک با خط زیرین) به دو انتهای پرایمرها افزوده شد:

F ctxB: aaaggatccATTAAATTAAAATTTGGTG / R ctxB: aatctcgagTTAATTTGCCATACTAATTG

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دو میکرولیتر DNA ژنومی ویبریوکلرا با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دو. میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۴۴ میکرولیتر آب مقطر عاری از نوکلئاز به تیوب‌های AccuPower Pfu PCR PreMix (BIONEER, Korea) انتقال داده شد. واکنش با ۳۰ چرخه دمایی متناوب شامل ۹۴، ۵۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، هر یک به‌مدت ۳۰ ثانیه، انجام شد. قبل از شروع اولین سیکل، مخلوط واکنش به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ و پس از آخرین سیکل نیز به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید زیر نور ماورای بنفش بررسی شد.

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب CtxB

محصول PCR حاصله و همچنین وکتور بیانی pET28a با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده BamHI و XhoI برش یافت و با استفاده از آنزیم T4 لیگاز (Thermo Fisher Scientific, USA) در داخل وکتور خطی کلون و در نهایت کانستراکت ساخته‌شده به باکتری E. coli سویه DH5α تیمارشده با کلسیم کلراید ترانسفرم شد. تایید کلونی‌های ترانسفرم‌شده با استفاده از کلونی- PCR و هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاصله به‌انجام رسید. یک کلونی از باکتری تاییدشده در ۱۰میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۳۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین کشت داده شد و پلاسمیدهای موجود با استفاده از کیت GeneJET Plasmid miniprep (Thermo Fisher Scientific, USA)استخراج شد. پلاسمید نوترکیب حاصله (pETctxB) به باکتری E. coli سویه BL21 (DE3)تیمارشده با کلسیم کلراید ترانسفرم و در نهایت از باکتری حاوی pETctxB برای تولید پروتئین استفاده شد. به این ترتیب که یک تک کلونی در محیط LB مایع حاوی ۳۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین، کشت داده شد و پس از رسیدن به فاز لگاریتمی رشد= (OD600 0.7) بیان پروتئین با افزودن یک میلی‌مولار IPTG القا شد. باکتری‌های القا شده پس از سه ساعت با استفاده از سانتریفیوژ برداشت شدند. بیان پروتئین با استفاده از الکتروفورز باکتری‌ها بر روی ژل آکریلامید تایید شد. پروتئین نوترکیب حاصله دارای دنباله پلی‌هیستیدینی در سمت امینو است، بنابراین برای تخلیص آن از افینیتی کروماتوگرافی با رزین‌های نیکل استفاده شد. غلظت پروتئین تخلیص‌یافته با استفاده از روش Bradford و خلوص آن با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آکریلامید ارزیابی شد.

ایمیونیزاسیون مرغ با استفاده از پروتئین نوترکیب CtxB

مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق دستورالعمل‌های کمیته سازمانی اخلاق با محوریت مطالعه‌های حیوانی و آزمایشگاهی به‌انجام رسید. تعداد ۶ مرغ بومی تخم‌گذار ۲۵ هفته‌ای تهیه شد. مرغها به دو گروه سه‌تایی تقسیم شدند. به گروه اول پروتئین نوترکیب CtxB و به گروه دوم که به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود فقط PBS تزریق شد. ایمیونیزاسیون در سه مرحله انجام شد، در هر مرحله ۵۰۰ میکرولیتر PBS یا مخلوط آنتی‌ژنی با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌داخل ماهیچه سینه مرغ‌ها تزریق می‌شد. در مرحله اول این مخلوط با استفاده از ادجوانت کامل فروند، در مرحله دوم (یک ماه بعد) با ادجوانت ناقص فروند و در مرحله سوم (یک ماه بعد) بدون استفاده از ادجوانت تزریق شد. پس از گذشت یک ماه از آخرین مرحله ایمیونیزاسیون، خون‌گیری از زیر بال هرکدام از گروههای مرغی انجام شد.

تعیین تیتر آنتی‌بادی تولیدشده توسط مرغ‌ها

برای این منظور میکروپلیت‌های الایزا با ۱۰۰میکرولیتر پروتئین نوترکیب CtxB با غلظت ۲/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه‌شده در بافر بی‌کربنات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۸،۴ به‌مدت یک شب پوشش‌دهی شد و سپس با استفاده از PBS-T (بافر PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین۲۰) برای چهار مرتبه شست‌وشو داده شد. چاهک‌ها به‌مدت یک ساعت با بافر PBS-T حاوی یک درصد آلبومین سرم گاوی در دمای اتاق بلاک شدند. سپس محتویات میکروپلیتها خالی شدند و در دمای اتاق نگه‌داری شدند تا کاملا خشک شوند. در مرحله بعد سرم هر یک از مرغ‌های دو گروه با رقت‌های مختلف از یک به ۵۰۰ تا یک به ۶۴،۰۰۰ با بافر PBS-T به‌صورت سریالی رقیق شده و به چاهک‌ها اضافه شدند. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میکروپلیت‌ها چهار مرتبه شست‌وشو داده شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین مرغی کونجوگه با آنزیم پراکسیداز (Sigma Aldrich, USA) با رقت یک به ۵۰۰۰ اضافه شد. پلیتها دوباره

3 repeat sequence transcriptional regulator

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]

به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از چهار بار شست‌وشو و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا واکنش رنگی به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی ایجاد شد. در نهایت واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک یک نرمال متوقف و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانش شد.

استخراج آنتی‌بادی‌های تولیدشده در تخم مرغ

با تعیین تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در هر مرغ، بهترین مرغ با بیشترین پاسخ آنتی‌بادی انتخاب و تخم‌های آن مرغ به مدت یک ماه جمع‌آوری و در یخچال نگه‌داری شدند تا تخلیص آنتی بادی مرغی (IgY)، از آنها انجام پذیرد.

برای تخلیص آنتی‌بادی مرغی پروتکل ارائه‌شده توسط Pauly و همکاران استفاده شد(۱۲). برای این منظور تخم‌مرغ با دقت شکسته و محتویات آن به قاشق مخصوص جداکننده زرده از سفیده منتقل شد. سپس زرده به روی یک کاغذ صافی انتقال یافت تا باقی‌مانده سفیده نیز از زرده جدا شود. با یک سوزن یا لانست به آرامی پوسته روی زرده پاره شد تا محتویات زرده داخل یک فالکون تخلیه شد. زرده تخم‌مرغ با PBS به اندازه دو برابر حجم خود به طورکامل مخلوط و مخلوط فوق به یک بشر انتقال یافت و روی هم‌زن مغناطیسی قرار داده شد. سپس از PEG ۶۰۰۰ به میزان ۳/۵ درصد(گرم در حجم) کم کم به مخلوط زرده و PBS، اضافه شد و مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه روی هم‌زن باقی ماند. این مخلوط به مدت ۲۰دقیقه در دمای ۴درجه سانتی‌گراد و با نیروی 13000×g سانتریفیوژ شد. مایع رویی به ظرف جدیدی منتقل و به آن ۸/۵ درصد PEG ۶۰۰۰ اضافه شد و مانند قبل تشکیل دو فاز و سانتریفیوژ به‌انجام رسید. این بار رسوب باقی‌مانده به‌آرامی در یک میلی‌لیتر PBS حل و سپس با PBS به حجم نهایی ۱۰میلی‌لیتر رسانده شد و به آن ۱۲درصد PEG ۶۰۰۰ اضافه شد و مانند مراحل قبل تشکیل دو فاز و سانتریفیوژ به‌انجام رسید. رسوب باقی‌مانده با دقت در ۸۰۰ میکرولیتر PBS حل شد. این محلول به مدت یک شب در سالین ۰/۱ درصد دیالیز شد و روز بعد سالین با PBS جایگزین و دیالیز به‌مدت سه ساعت ادامه یافت. غلظت پروتئین تخلیص‌یافته با روش Bradford و خلوص آن با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریلامید سنجش شد.

کنجوگاسیون آنتی‌بادی‌های IgY ضد CtxB با آنزیم HRP

برای انجام کنجوگاسیون از روش سدیم پریودیت استفاده شد(۱۳). ابتدا میزان ۱۵ میلی‌گرم آنزیم HRP (Sigma Aldrich, USA) در۱۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده و سپس ۱۵۰ میکرولیتر سدیم پریودیت ۰/۱ مولار اندک اندک به محلول اضافه شد. این محلول به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در حال هم‌زدن آهسته انکوبه شد تا رنگ محلول از قهوه‌ای به سبز تغییر کرد. آنزیم فعال‌شده در برابر بافراستات سدیم یک میلی‌مولار با pH ۴,۴ به‌مدت یک شب در دمای ۴درجه سانتی‌گراد دیالیز و طی این مدت سه بار بافر تعویض شد. محلولی با غلظت ۸میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بادی تهیه و با بافر کربنات- بی‌کربنات ۰/۵ مولار pH ۹,۵ دیالیز شد. ۵۰۰میکرولیتر از آن با آنزیم فعال‌شده HRP به‌مدت دوساعت در حال چرخش آهسته مجاور شدند. در نهایت برای پایان دادن به واکنش، میزان ۴۰۰میکرولیتر از محلول سدیم بوروهیدرات با غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به آرامی به محلول حاوی پروتئین و آنزیم اضافه به‌مدت یک ساعت انکوبه شد. این محلول به‌مدت یک شب در دمای ۴درجه سانتی‌گراد در برابر بافر PBS و با سه‌بار تعویض بافر دیالیز شد. اینتگراز کنجوگه با HRP در محلول ۰ درصد گلیسرول و BSA (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مخلوط و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

بهینه‌سازی روش الایزای ساندویچ برای تشخیص پروتئین CtxB

برای انجام این کار از سوپرناتانت کشت ویبریوکلرا سویه O1 (اینابا) (PTCC No: ۱۶۱۱) و Escherichia coli (PTCC No: ۱۳۹۵) به‌عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شد. برای القای تولید سم از روش AKI-SW استفاده شد(۱۴)، به این ترتیب که ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت AKI شامل (۱/۵ درصد Bacto Peptone، ۰/۴ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ درصد سدیم کلراید و ۰/۳ درصد NaHCO3) به لوله‌های آزمایش با نسبت سطح به حجم کم (ارتفاع ۱۵۰میلی‌متر و قطر ۱۵میلی‌متر) منتقل و حدود ۱۰۶ باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط کشت داده شد. لوله‌ها به‌مدت چهار ساعت به‌صورت ثابت در انکوباتور قرار گرفتند و پس از آن محتویات لوله‌ها به فلاسک‌های ارلن مایر ۱۰۰میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۵تا ۲۰ساعت در حال حرکت دورانی با سرعت ۲۰۰دور در دقیقه انکوبه شدند. تمام مراحل انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. سپس محیط کشت به‌مدت ۲۰دقیقه و با نیروی ۱۴۰۰۰ xg در دمای ۴درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت برای انجام مراحل بهینه‌سازی الایزا جدا شد. برای بهینه‌سازی الایزا، محلول‌هایی با غلظت‌های ۱۰، ۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بادی IgY ضد CtxB در بافر بی‌کربنات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۸,۴ تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر غلظت به‌صورت دوتایی به چاهک‌های میکروپلیت الایزا افزوده شد. پلیت به مدت یک شب در دمای اتاق نگه‌داری شد تا آنتی‌ژنها به طورکامل کف چاهک‌ها را بپوشانند. پس از چهار مرتبه شست وشو ۱۰۰ میکرولیتر از بافر مسدودکننده داخل هر چاهک ریخته شد و پلیتها به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس پلیتها خالی شدند و در دمای اتاق نگه‌داری شدند تا به طور خشک شوند. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت کشت‌های میکروبی تهیه‌شده به هر چاهک اضافه شدد و میکروپلیتها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از چهار بار شست‌وشو مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی IgY کونجوگه با آنزیم پراکسیداز با رقت‌های یک به ۱۰۰ تا یک به ۱۲,۸۰۰، به تمام چاهک‌ها اضافه شد. پلیتها دوباره به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شده و سپس چهار بار شست‌وشو داده شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB داخل هر چاهک ریخته شد. پلیتها بلافاصله به مدت ۱۵دقیقه درتاریکی قرار داده شدند و در نهایت واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از محلول اسید کلریدریک یک نرمال متوقف شد. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از بررسی میزان سیگنال در چاهک‌های مربوط به کنترل مثبت و منفی، میزان بهینه مورد نیاز آنتی‌بادی‌های تسخیری و شناساگر مشخص شد.

بررسی حساسیت آنالیتیکی روش الایزای تنظیم‌شده

در این مرحله برای تعیین حساسیت آنالیتیکی روش الایزای تنظیم‌شده، به تعیین حد شاهد (LOB [4]) و حد تشخیص (LOD [5]) در آن پرداخته شد. برای انجام این کار با استفاده از پروتئین نوترکیب CtxB محلولی با غلظت ۱۰۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و از این محلول هفت رقت سریالی دوبرابری تا غلظت ۷/۸ پیکوگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس میکروپلیت الایزا با ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی IgY ضد CtxB با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پوشش‌دهی و بلاک شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های آنتی‌ژنی تهیه‌شده به‌صورت دوتایی به چاهک‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از چهار مرتبه شست‌وشو مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی IgY ضد CtxB کونجوگه با آنزیم HRP با رقت یک به ۶,۴۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد. تعداد ۲۰چاهک از پلیت نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و در آن‌ها تنها بافر رقیق‌کننده نمونه (PBS-T) اضافه شد. پلیتها دوباره به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از چهار مرتبه شست‌وشو، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB داخل هر چاهک ریخته شد. پس از ۱۵دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و تاریکی، واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به هر چاهک متوقف شد. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. میانگین و انحراف معیار جذب نوری ۲۰چاهک مربوط به بلانک تعیین و مقادیر LOB و جذب نوری LOD با استفاده از معادلات زیر محاسبه شد(۱۵-۱۶) :

$$LOB=Mean_{Blank}+1.645(SD_{Blank})$$

$$Ab_{LOD}=Mean_{Blank}+3(SD_{Blank})$$

در مرحله بعد، با استفاده از داده‌های حاصل از رقت سریالی آنتی‌ژن، منحنی و

4 Limit of Blank

5 Limit of Detection

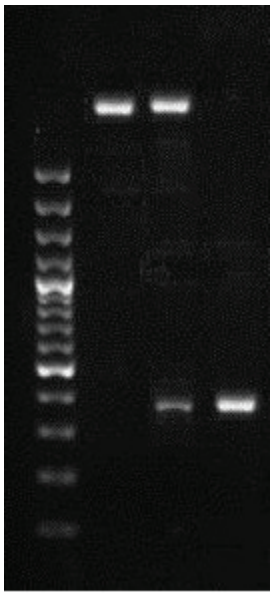
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]

معادله خط مربوطه رسم و میزان LOD برای روش طراحی‌شده تعیین شد.

یافته‌ها:

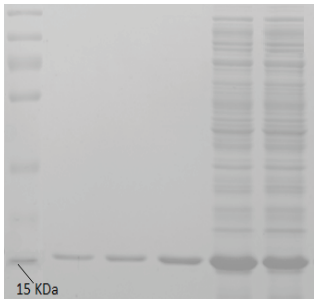
تکثیر، کلونینگ و بیان ژن ctxB و تخلیص پروتئین نوترکیب حاصله

تکثیر ژن ctxB با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده به ایجاد محصولی ۳۹۰ جفت‌بازی منجر شد. ترانسفرماسیون محصول لیگاسیون ژن فوق با وکتور بیانی pET28a به باکتری E.coli سویه DH5α به رشد باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین منجر شد که نشان‌دهنده حضور پلاسمید نوترکیب حاصله (pETctxB) در این باکتری بود. آزمایش کلونی–PCR و هضم آنزیمی چند کلونی مقاوم به کانامایسین، به ایجاد قطعاتی با سایز مورد نظر منجر شد و به‌این ترتیب صحت کلونینگ تایید شد(شکل ۱).



شکل ۱. تایید صحت کلونینگ ژن ctxB با استفاده از برش آنزیمی و PCR
از سمت چپ به راست: ستون ۱. مارکر DNA، ستون ۲. پلاسمید pETctxB برش‌نیافته، ستون ۳. پلاسمید pETctxB برش‌یافته با دو آنزیم BamHI و XhoI، ستون ۴. محصول حاصل از کلونی PCR– با پرایمرهای اختصاصی ژن ctxB

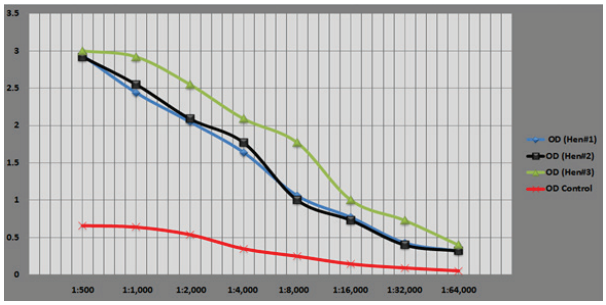
الکتروفورز باکتری BL21 (DE3) القایافته حاوی pETctxB وجود باند پروتئینی با سایز ۱۷کیلودالتون را که معادل سایز محاسبه شده برای پروتئین نوترکیب CtxB بود، اثبات کرد. تخلیص پروتئین حاوی دنباله هیستیدینی با استفاده از رزین نیکل به تولید پروتئینی با خلوص بیش از ۹۵ درصد بر اساس SDS-PAGE منجر شد(شکل ۲) و میزان نهایی پروتئین خالص حاصله معادل ۳۸ میلی‌گرم در ازای یک لیتر کشت باکتری بود.



شکل ۲. بررسی روند تخلیص پروتئین نوترکیب CtxB
از راست به چپ: ستون ۱. لیزات باکتری، ستون ۲ تا ۴ پروتئین‌های تخلیص‌یافته در سه تیوب مختلف، ستون ۵. مارکر وزن ملکولی پروتئین.

تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در مرغ‌های ایمیونیزه با CtxB نوترکیب

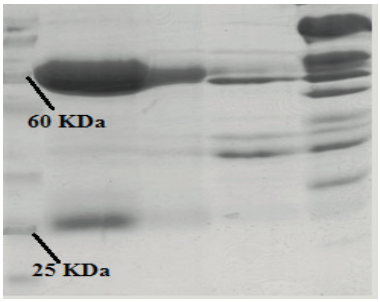
بررسی میزان آنتی‌سرم در مرغهای ایمیونیزه شده و نیز گروه شاهد انجام شد. نمودار نتایج آزمون الایزا در نمودار شماره ۱ قابل مشاهده است. تیتر آنتی‌بادی تولیدشده در مرغ‌های ایمیونیزه معادل یک به ۳۲،۰۰۰ بود. مرغ شماره ۳، بیشترین تیتر آنتی‌بادی ضد CtxB را تولید کرد و بنابراین در مرحله بعدی از تخم‌های این مرغ برای تخلیص IgY مورد نظر استفاده شد.



نمودار ۱. تیتراسیون رقت‌های سرمی IgY تولید شده در سرم سه مرغ ایمن‌شده با CtxB (منحنی‌های سبز، آبی و مشکی) و مقایسه آن با مرغ کنترل منفی (منحنی قرمز). محور عمودی: جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر، محور افقی: رقت‌های سرمی استفاده شده

ارزیابی آنتی‌بادی‌های IgY تخلیص‌شده از زردهٔ تخم‌مرغ

تخم‌های مرغ ایمن‌شده، طی یک ماه جمع‌آوری شد. سپس فرآیند تخلیص آنتی‌بادی از زرده تخم‌مرغها انجام شد. بررسی روند خالص‌سازی آنتی‌بادی با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید انجام شد. این بررسی نشان داد، هر چه مراحل تخلیص پیشتر میرود، خلوص آنتی‌بادی بالاتر رفته به‌طوری که در ستون مربوط به IgY خالص، دو باند قطور با اندازه‌های ۶۰ و ۲۵ کیلودالتون که به‌ترتیب نشان دهنده دو زنجیره سنگین و سبک آنتی‌بادی است، دیده می‌شد(شکل۳). متوسط میزان آنتی‌بادی تخلیص‌یافته از هر تخم‌مرغ ۵۰/۹ میلی‌گرم محاسبه شد.



شکل ۳. مراحل تخلیص IgY از زرده تخم مرغ ایمن. به ترتیب از راست به چپ: ستون ۱. زرده تخم مرغ محلول در PBS، ستون ۲. IgY ناخالص پس از اضافه کردن PEG5/3درصد، ستون ۳. IgY نیمه‌خالص پس از اضافه کردن PEG 5/8 درصد، ستون 4. IgY خالص، ستون ۵. مارکر وزن ملکولی پروتئین

بهینه‌سازی روش الایزای ساندویچ با استفاده از آنتی‌بادی IgY تولیدشده علیه CtxB

بر اساس نتیج حاصل از فرآیند بهینه‌سازی، میزان مناسب آنتی‌بادی α-CtxB برای پوشش‌دهی میکروپلیت‌های الایزا ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان مناسب α-CtxB-HRP رقت یک به ۶،۴۰۰ تعیین شد. در این شرایط ضمن اینکه کنترل مثبت در طول موج ۴۵۰ نانومتر سیگنال بیشتر از ۳ تولید می‌کرد، میزان متوسط سیگنال کنترل منفی کمتر از ۸درصد بود.

حساسیت آنالیتیک روش الایزای تنظیم‌شده

آزمایش تعیین حساسیت آنالیتیک روش الایزای تنظیم‌شده با استفاده از رقت‌های سریالی پروتئین CtxB نوترکیب انجام شد. نمودار و فرمول خط حاصله برای

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]

محاسبه حد تشخیصی روش، استفاده شدند. علاوه بر این برای تعیین محدوده تشخیصی، میانگین سیگنال چاهک‌های بلانک و میزان انحراف معیار مربوطه نیز محاسبه شد. یافته‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش در جدول شماره ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱. نتایج مربوط به محاسبه حساسیت آنالیتیکی روش الایزای تنظیم‌شده

ELISA	Mean OD of Blanks	SD of Blanks	LOB	Absorbance of LOD	Line Equation	LOD
α-ctxB	087/0	022/0	123/0	153/0	y = 0031/0 + 0508/0	33 pg/ml

بحث :

بیماری وبا در مناطقی که به‌صورت اندمیک درگیر این بیماری هستند، به‌دلیل گسترش سریع و ایجاد اپیدمی‌های وسیع، بار اقتصادی سنگینی ایجاد می‌کند. این بیماری در حال حاضر در آفریقا، جنوب و شرق آسیا به‌صورت اندمیک به چشم می‌خورد(۱۷). در سال‌های اخیر موارد گزارش‌شده وبا به‌تدریج افزایش یافته، به‌طوری‌که سالانه بین ۱/۳ تا ۴ میلیون مورد ابتلا و بین ۲۱،۰۰۰ تا ۱۴۳،۰۰۰ مورد مرگ ناشی از وبا گزارش شده است(۱۸). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که تعداد درگیری‌های وبا در مناطق مستعد در سال‌های آینده افزایش می‌یابد، این مسئله می‌تواند ناشی از ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و نیز افزایش وقایع منجر به بدی آب و هوا باشد(۱۹).

مقابله با این تهدید، توجه بیشتر نسبت به سلامت عمومی را از طریق ارتقای بهداشت می‌طلبد. استفاده از واکسیناسیون و روش‌های تشخیص سریع دو راهکار عمده برای دستیابی به این هدف هستند. در صورت تشخیص به‌موقع شیوع وبا در مراحل آغازین، می‌توان بیماری را با هدف کاهش تعداد مبتلایان و دوره درگیری به‌نحو مؤثری تحت کنترل درآورد. به‌همین دلیل به‌کارگیری روش‌های تشخیصی سریع، ارزان و با قابلیت استفاده در خارج از آزمایشگاه، کمک بسیار عمده‌ای را در راستای کنترل بیماری فراهم می‌آورد. همچنین با توجه به اینکه انتقال وبا به طورعمده به دلیل خوردن آب و مواد غذایی آلوده انجام می شود و بیماری‌های منتقله از راه غذا یکی از نگرانی‌های اصلی بهداشت عمومی و ایمنی غذایی را به خود اختصاص می‌دهند(۲۰) و از طرفی احتمال آلوده‌سازی آب و مواد غذایی با هدف بیوتروریسم نیز عامل دیگری است که حصول اطمینان از ایمنی آب و مواد غذایی را به عاملی مهم مبدل کرده است(۲۱)، بنابراین در پاسخ به این نگرانی‌ها روش‌های آزمایشگاهی بسیاری برای تشخیص توکسین‌ها و عوامل بیماری‌زا در مواد غذایی و آشامیدنی راه‌اندازی شده‌اند (۲۲-۲۴).

بنابراین با توجه به اهمیت کاربردی و بالینی روش‌های سریع شناسایی توکسین وبا در نمونه‌های مواد غذایی، بالینی و محیطی، در این مطالعه به تولید آنتی‌بادی مرغی اختصاصی برای تشخیص سیتوتوکسین وبا اقدام شد و سپس کارآیی آنتی‌بادی تولیدشده با روش الایزای ساندویچ ارزیابی شد. برای رسیدن به این هدف اقدام به طراحی و راه‌اندازی روش الایزای ساندویچ بر اساس آنتی‌ژن CtxB ویبریوکلرا شد. براساس بررسی‌های انجام شده تا کنون، این اولین موردی است که در آن آنتی‌بادی‌های IgY برای تشخیص ویبریوکلرا استفاده شدند. مرغها، منبع بزرگی از مقادیر فراوان آنتی‌بادی اختصاصی را در اختیار قرار میدهند. بر اساس پژوهشی که در این راستا انجام شده، تولید آنتی‌بادی از زرده تخم مرغ نزدیک به ۱۸برابر بیشتر از خرگوش است. علاوه بر این مزیت مهم، تولید IgY غیر تهاجمی است که در مقایسه با خون‌گیری که در پستانداران برای کسب آنتی‌بادی انجام میگیرد، فقط نیاز به جمع کردن تخم مرغ دارد(۲۵). بنابراین استفاده از چنین رویکردی امکان استفاده از دستاوردهای حاصل از این مطالعه را برای اهداف تولید تجاری روش ارائه‌شده تسهیل می‌کند.

تاکنون روشهای مختلفی برای جداسازی و تخلیص IgY از زرده تخم‌مرغ توصیف شده است، این روش‌ها به سه دسته کلی ته‌نشین‌سازی، کروماتوگرافی و اولترافیلتراسیون تقسیم میشوند(۲۶). در این مطالعه از روش ته‌نشین‌سازی با پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شد. PEG به طورکامل پودرشده و به تناوب در درصدهای مختلف استفاده شد. PEG پلیمری با خاصیت فشرده و دفع کننده پروتئین است و چنین ترکیب‌هایی میتوانند پروتئین را به خارج از محلول منتقل کنند(۲۷). استفاده از PEG به‌صورت پودرشده باعث تماس بهتر آن با زرده تخم‌مرغ میشود. تمام این موارد سبب شد که IgY به مقدار بیشتر و با خلوص بهتر از زرده تخم مرغ جدا شد. بازده IgY تخلیص‌شده در مطالعه‌های مختلف بسیار متفاوت است. در بررسی انجام شده توسط Pauly و همکارانش، توانستند تا میزان ۶۰ میلی‌گرم IgY را از هر تخم‌مرغ خالص کنند(۱۲) این در حالی است که در مطالعه دیگری که توسط همین گروه انجام شد میزان تولید IgY خالص معادل ۳۵ و ۲۸/۸ میلی‌گرم به ازای هر تخم‌مرغ گزارش شده است(۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ برای تولید IgY علیه آنتی‌ژن‌های محلول توکسوپلاسما گوندی انجام شده است، محققان توانستند ۴۸ میلی‌گرم آنتی‌بادی مرغی خالص از هر تخم‌مرغ تولید کنند(۲۸). در همین سال گروه دیگری به تولید آنتی‌بادی مرغی علیه ویروس غیرفعال‌شده انفلوانزای B اقدام کردند، در این بررسی برای تخلیص آنتی‌بادی‌ها از پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شد و توانستند ۷۶/۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی از هر تخم‌مرغ تولید کنند(۲۹). در بررسی انجام شده در این پژوهش میزان آنتی‌بادی خالص به‌دست‌آمده علیه معادل ۵۰/۹ میلی‌گرم به‌ازای هر تخم‌مرغ است که در نتایج حاصل از بررسی‌های ذکرشده مشابه از بازده قابل قبولی برخوردار است.

در الایزای طراحی‌شده در این مطالعه، میزان حساسیت آنالیتیکی معادل ۳۳ پیکوگرم بر میلی‌لیتر CtxB برآورد شد. روش‌های بسیاری برای تشخیص سم وبا با حساسیت‌های مختلف طراحی شده‌اند. در متد ارائه‌شده توسط Ngundi و همکاران که یک روش مبتنی بر منوساکارید است حداقل میزان تشخیص سم وبا ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر است(۳۰). روش‌های مبتنی بر رسپتور گانگلیوزید GM1 نیز توسط پژوهشگران ابداع شده‌اند که محدوده تشخیص سم وبا را به ۱۵ تا ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر رسانده‌اند(۳۱). همچنین در یک روش ایمنواسی مبتنی بر هیدروژل که در سال ۲۰۰۶ توسط Charles و همکارانش معرفی شد، محدوده تشخیصی سم کلرا به یک نانوگرم بر میلی‌لیتر ارتقا یافت(۳۲). از طرفی در روش الایزای طراحی‌شده توسط Ramamurthy امکان تشخیص مستقیم توکسین وبا در نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به اسهال شدید آبکی ارزیابی و محدوده تشخیصی بین ۲۶ پیکوگرم تا ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر گزارش شد(۳۳). در بررسی دیگری که توسط Tuteja و همکارانش انجام شد، به طراحی و راه‌اندازی یک روش الایزای ساندویچ روی غشا اقدام شد. در این پژوهش از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال خرگوشی علیه CtxB به‌عنوان آنتی‌بادی‌های تسخیری و از آنتی‌بادی منوکلنال تولیدشده علیه همین آنتی‌ژن به‌عنوان آنتی‌بادی شناساگر استفاده شد. حساسیت آنالیتیکال این روش معادل ۶۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای CtxB گزارش شده است(۶) . همچنین در پژوهش دیگری که در آن به طراحی و ارزیابی یک روش ایمنوکروماتوگرافی برای تشخیص پروتئین کامل سیتوتوکسین وبا پرداخته شده، حد تشخیصی روش ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است(۷).

در پژوهش حاضر برای دستیابی به روشی با حساسیت بالا، به بهینه‌سازی تست الایزا با استفاده از تیتراسیون شطرنجی۶ پرداخته شد. با این رویکرد میزان بهینه برای پوشش‌دهی و رقت آنتی‌بادی کنجوگه مورد نیاز به‌دقت تعیین و به این ترتیب با بررسی همزمان اثر چند فاکتور مجزا، روش الایزا با صرف کمترین تعداد آزمایش بهینه‌سازی شد. برای تعیین حد تشخیصی روش از بررسی میزان سیگنال حاصل از رقت‌های سریالی تهیه‌شده با محلول حاوی CtxB نوترکیب استفاده شد و با توجه به محدوده تشخیصی برآوردشده می‌توان گفت که حساسیت این روش در

1- Checkerboard Titration

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]

مقایسه با روش‌های تشخیصی مشابه که پیش‌تر به آنها اشاره شد، بالاتر است. یک دلیل این برتری می‌تواند استفاده از آنتی‌بادی‌های مرغی باشد که به دلیل غلظت بالا، امکان دستیابی به خلوص بالاتر را فراهم می‌آورند و همین مسئله در نهایت حساسیت و اختصاصیت بالاتر روش ایمنواسی مبتنی بر آن‌ها را ممکن می‌کند. نکته دیگری که در این ارتباط باید بیان کرد این است که در بسیاری از تست‌های ایمنواسی مورد اشاره، آنتی‌بادی‌ها روی غشا فیکس شده‌اند. در حالی که در روش ارائه‌شده در این پژوهش از میکروپلیت‌های الایزا برای تثبیت آنتی‌بادی‌ها و انجام واکنش استفاده شده است؛ بنابراین دور از انتظار نیست که واکنش‌های انجام شده در میکروپلیت‌های الایزا سیگنال بهتری نسبت به واکنش انجام شده روی غشا ایجاد کنند.

مطالعه حاضر گزارشی از روند بهینه‌سازی و راه‌اندازی الایزای تشخیصی برای سم ویبریو کلراست که ضروری است در آینده بیشتر بررسی و ارزیابی شوند. از موارد مهمی که در این ارزیابی‌ها باید مدنظر قرار گیرد، می‌توان به بررسی کارآیی و حساسیت آنالیتیکی تست در نمونه‌های استخراج‌شده از مواد غذایی و نمونه‌های بالینی اشاره کرد. حساسیت گزارش‌شده در این بررسی، با استفاده از بافرهای استاندارد تعیین شده، این در حالی است که در بیشتر روش‌های تشخیصی، ماتریکس موجود در مواد غذایی باعث کاهش حساسیت روش تشخیصی می‌شود. به‌طوری که گاهی محدوده تشخیصی تست هنگام بررسی مواد غذایی به‌میزان ۱۰ تا ۲۰ برابر نسبت به حساسیت گزارش شده با سیستم‌های بافری استاندارد افت می‌کند(۳۴). بنابراین لازم است در آینده بررسی دقیق‌تری از کارآیی این روش در تشخیص مقادیر اندک سم ویبریو در نمونه‌های آب و مواد غذایی و همچنین نمونه‌های بالینی مانند مدفوع یا استفراغ به‌عمل آمده و میزان حساسیت آن نسبت به شرایط استاندارد ارزیابی شود. همچنین مسئله دیگری که لازم است مورد توجه و بررسی قرار گیرد، میزان ویژگی روش الایزای طراحی‌شده است، به‌ویژه آن‌که توالی کلرا توکسین حدود ۸۰درصد با سم حساس به حرارت تولیدشده توسط enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) شباهت دارد(۳۵). با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز تست الایزای طراحی‌شده با آنتی‌بادی مرغی حاصله، در نظر داریم در آینده ارزیابی‌های دقیق‌تری از این روش به انجام برسانیم.

در این پژوهش به تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال مرغی علیه سیتوتوکسین B ویبریو کلرا و با استفاده از این آنتی‌بادی‌ها اقدام به طراحی و ارزیابی یک روش الایزا برای تشخیص سم این باکتری اقدام شد. این اولین گزارشی است که در آن از آنتی‌بادی مرغی برای راه‌اندازی روش ایمنواسی تشخیص ویبریوکلرا استفاده می‌شود. روش تنظیم‌شده از حساسیت آنالیتیک بسیار خوبی برخوردار است، به‌نحوی که از آن می‌توان در آینده برای تولید کیت‌های الایزا با هدف تشخیص سم در نمونه‌های محیطی یا بالینی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله بخشی از یک پایان‌نامه دکترای تخصصی میکروبیولوژی است که در بخش بیوتکنولوژی تشخیصی انستیتو پاستور ایران به انجام رسیده است. از این طریق از تمامی همکاران و استادان این بخش که صمیمانه ما را در انجام مراحل پژوهشی این طرح همکاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع:

1. Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2011;4(7):573-80.
2. Morris JG, Acheson D. Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. Clinical Infectious Diseases. 2003;37(2):272-80.
3. Octavia S, Salim A, Kurniawan J, Lam C, Leung Q, Ahsan S, et al. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 Vibrio cholerae by multilocus sequence typing. PLoS One. 2013;8(6):e65342.
4. Boyd EF, Heilpern AJ, Waldor MK. Molecular analyses of a putative CTXφ precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTXφs by toxigenic Vibrio cholerae. Journal of bacteriology. 2000;182(19):5530-8.
5. Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae, Chapter 6. LABORATORY IDENTIFICATION OF VIBRIO CHOLERAE Centers for Disease Control and Prevention p. 38-67.
6. Tuteja U, Kumar S, Shukla J, Kingston J, Batra HV. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic Vibrio cholerae from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. J Med Microbiol. 2007 Oct;56(Pt 10):1340-5.
7. Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Morimatsu F, Kurazono T, Hiroi T, et al. Development of an immunochromatographic test strip for detection of cholera toxin. Biomed Res Int. 2013;2013:679038.
8. JP Yadava MJaAG. Detection and confirmation of toxigenic Vibrio cholerae O1 in environmental and clinical samples by a direct cell multiplex. Water SA. 2013;39(5):611-4.
9. Nandi B, Nandy RK, Mukhopadhyay S, Nair GB, Shimada T, Ghose AC. Rapid method for species-specific identification of Vibrio cholerae using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. J Clin Microbiol. 2000 Nov;38(11):4145-51.
10. Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, Ishibashi M, Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing Vibrio cholerae using a loop-mediated isothermal amplification. BMC Microbiol. 2008 Jun 12;8:94.
11. Kim EJ, Lee D, Moon SH, Lee CH, Kim DW. CTX prophages in Vibrio cholerae O1 strains. J Microbiol Biotechnol. 2014 Jun 28;24(6):725-31.
12. Pauly D, Chacana PA, Calzado EG, Brembs B, Schade R. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. J Vis Exp. 2011(51).
13. Wisdom GB. Horseradish Peroxidase Labeling of IgG Antibody. The Protein Protocols Handbook: Springer; 2002. p. 347-8.
14. Iwanaga M, Yamamoto K, Higa N, Ichinose Y, Nakasone N, Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by Vibrio cholerae O1 El Tor. Microbiol Immunol. 1986;30(11):1075-83.
15. David A Armbruster TP. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. Clin Biochem Rev. 2008;29.
16. Longjiao Zhu JH, Xiaohan Cao, Kunlun Huang, Yunbo Luo, Wentao Xu. Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of Bacillus Cereus in food. Scientific Reports 2016;6(16092).
17. Emch M FC, Islam MS and Ali M. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns. International Journal of Health Geographics. 2008;7(31).
18. Ali M, Nelson, Allyson R. Lopez, Anna Lena Sack, David A. Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2015;9(6):e0003832.
19. Michal H. Dick MG, Francis Moussy, Claire-Lise Chaignat. Review of Two Decades of Cholera Diagnostics – How Far Have We Really Come? PLOS Neglected Tropical Diseases. 2012;6(10).
20. Meng J, Doyle M. Emerging issues in microbiological food safety. Annual review of nutrition. 1997;17(1):255-75.
21. Khan AS, Swerdlow DL, Juranek DD. Precautions against biological and chemical terrorism directed at food and water supplies. Public Health Reports. 2001;116(1):3-14.
22. Notermans S, Wernars K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. International journal of food

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]

microbiology. 1991;12(1):91-102.
23. Pimbley D, Patel P. A review of analytical methods for the detection of bacterial toxins. Journal of Applied Microbiology. 1998;84:98S.
24. Hall RH. Biosensor technologies for detecting microbiological foodborne hazards. Microbes and infection. 2002;4(4):425-32.
25. Schade R, Zhang X-Y, Terzolo H. Use of IgY Antibodies in Human and Veterinary Medicine. In: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editors. Bioactive Egg Compounds: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 213-22.
26. Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. Journal of immunological methods. 1998 Jun 1;21, 7-1: (2-1)5.
27. Lovrien RE, Matulis D. Selective Precipitation of Proteins. Current Protocols in Protein Science: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
28. Ferreira Júnior Á, Santiago FM, Silva MV, Ferreira FB, Macêdo Júnior AG, Mota CM, et al. Production, Characterization and Applications for Toxoplasma gondii-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. PLoS One. 2012;7(7):e40391.
29. Wen J, Zhao S, He D, Yang Y, Li Y, Zhu S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. Antiviral research. 2012;93(1):154-9.
30. Ngundi MM, Taitt CR, McMurry SA, Kahne D, Ligler FS. Detection of bacterial toxins with monosaccharide arrays. Biosensors and Bioelectronics. 2006;21(7):1195-201.
31. Svennerholm A, Wiklund G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Journal of Clinical Microbiology. 1983;17(4):596-600.
32. harles PT, Velez F, Soto CM, Goldman ER, Martin BD, Ray RI, et al. A galactose polyacrylate-based hydrogel scaffold for the detection of cholera toxin and staphylococcal enterotoxin B in a sandwich immunoassay format. Analytica chimica acta. 2006;578(1):2-10.
33. Ramamurthy T, Bhattacharya S, Uesaka Y, Horigome K, Paul M, Sen D, et al. Evaluation of the bead enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cholera toxin directly from stool specimens. Journal of Clinical Microbiology. 1992;30(7):1783-6.
34. Ahn S, Durst RA. Detection of cholera toxin in seafood using a ganglioside-liposome immunoassay. Analytical and bioanalytical chemistry. 2008;391(2):473-8.
35. Sánchez J, Holmgren J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. Current opinion in immunology. 2005;17(4):388-98.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2024-05-27]