

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

Mahdie Bayat¹, Alireza Khabiri^{*2}, Behzad Hemati¹

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

تولید آنتی بادی مرغی ضد زیر واحد B توکسین ویبریوکلرا و راه اندازی روش الایزا برای تشخیص سم ویبریوکلرا

مهدیه بیات^۱، علیرضا خیبری^{۲*}، بهزاد همتی^۱

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران
۲- بخش فرآورده های 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 نمونه هایی مانند آب یا غذا، در این مطالعه به طراحی و راه اندازی یک روش ایمنواسی برای شناسایی مستقیم سیتوتوکسین B این باکتری، با استفاده از آنتی بادی مرغی لقدام شده است.

مواد و روش ها: توالی ژنی *ctxB* در وکتور بیانی *pET28a* کلون شده و سپس در باکتری *BL21 (DE3)* بیان شد. پروتئین های نو ترکیب حاصله پس از تخلیص با روش ایمنوکروماتوگرافی، به صورت درون ماهیچه ای به مرغ تزریق و آنتی بادی پلی کلونال ضد پروتئین *CtxB* با استفاده از پلی اتیلن گلیکول از زرده تخم مرغ تخلیص شدند. این آنتی بادی ها برای طراحی یک روش الایزای ساندویچ استفاده شدند. حساسیت آنالیتیک روش طراحی شده با استفاده از رقت های سریالی پروتئین *CtxB* نو ترکیب ارزیابی شد.

یافته ها: در ازای هر لیتر کشت باکتری *BL21 (DE3)* حاوی پلاسמיד دربرگیرنده ژن *ctxB*، ۳۸ میلی گرم پروتئین نو ترکیب با خلوص بیش از ۹۵ درصد تولید شد. تیر آنتی بادی ضد *CtxB* در خون مرغ ایمونیزه برابر با یک به ۳۲/۰۰۰ بود و میزان ۵۰/۹ میلی گرم آنتی بادی مرغی از هر تخم مرغ خالص شد. روش الایزای طراحی شده با این آنتی بادی امکان تشخیص *CtxB* را تا غلظت ۳۳ پیکوگرم بر میلی لیتر فراهم کرد.

نتیجه گیری: آنتی بادی های مرغی ضد *CtxB* تولید شده در این مطالعه، امکان ایجاد یک روش ایمنواسی را فراهم کردند که با آن تشخیص سریع و با حساسیت بالای سیتوتوکسین B فراهم می شود. ضروری است در آینده کارایی این روش برای تشخیص سم ویبریو در نمونه های محیطی مانند آب یا مواد غذایی بررسی شود.

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

مقدمه:

دارند. حضور سم کلرا (CT¹)، جزایر پاتوژنیسیته و پیلای تنظیم شونده با توکسین^۲ در سرگروه های O1 ویبریوکلرا، عواملی هستند که موجب بیماری زایی بیشتر این سویه ها نسبت به سویه های غیر O1 می شوند (۴). روش استاندارد طلایی برای تشخیص این عفونت که مبتنی بر جداسازی و شناسایی عامل باکتریایی است، بسیار پیچیده، وقت گیر و هزینه بر است. از سوی

وبا بیماری عفونی و ویژگی اصلی آن اسهال آبکی و استفراغ در انسان است. عامل این بیماری باکتری گرم منفی کاما شکل و بی هوازی اختیاری ویبریوکلرا است (۱). این باکتری دارای سویه های بیماری زا و غیر بیماری زا است و سویه های تولید کننده سم کلرا، عامل ایجاد پاندمی های وبا هستند (۲). در بسیاری از نقاط دنیا سرگروه های O باکتری با ایجاد اسهال ارتباط دارند (۳). ژنوم سویه های بیماری زای ویبریوکلرا پروتئین هایی را کد می کنند که به طور مستقیم یا غیر مستقیم در ایجاد بیماری نقش

Cholera Toxin	1
Toxin co-regulated pillus	2

نویسنده مسئول: علیرضا خیبری

پست الکترونیک: khabiri@pasteur.ac.ir

میکرومولار و ۴۴ میکرولیتر آب مقطر عاری از نوکلئاز به تیوب‌های AccuPower (BIONEER, Korea) PCR PreMix (BIONEER, Korea) انتقال داده شد. واکنش با ۳۰ چرخه دمایی متناوب شامل ۹۴، ۵۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد، هر یک به مدت ۳۰ ثانیه، انجام شد. قبل از شروع اولین سیکل، مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ و پس از آخرین سیکل نیز به مدت 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 تیمار شده با کلسیم کلراید ترانسفرم شد. تایید کلونی‌های ترانسفرم شده با استفاده از کلونی-PCR و هضم آنزیمی پلاسمیدهای حاصله به‌انجام رسید. یک کلونی از باکتری تاییدشده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۳۰ میکروگرم 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) تیمار شده 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 ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین، کشت داده شد و پس از رسیدن به فاز لگاریتمی (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 آکرلامید تایید شد. پروتئین نوترکیب حاصله دارای دنباله پلی‌هیستیدینی در سمت آمینو 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 آکرلامید ارزیابی شد.

ایمونیزاسیون 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 ستهایی تقسیم شدند. به گروه اول پروتئین نوترکیب CtxB و به گروه دوم که به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده بود فقط PBS تزریق شد. ایمونیزاسیون 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 ایمونیزاسیون، خون‌گیری از زیر بال هر کدام از گروه‌های مرغی انجام شد.

تعیین تیتر آنتی‌بادی تولیدشده توسط مرغ‌ها

برای این منظور میکروپلیت‌های الایزا با ۱۰۰ میکرولیتر پروتئین نوترکیب CtxB با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه‌شده در بافر بی‌کربنات سدیم ۰/۱ مولار با pH ۸/۴ به مدت یک شب پوشش‌دهی شد و سپس با استفاده از PBS-T (بافر) PBS حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰ برای چهار مرتبه شست‌وشو داده شد. چاهک‌ها به مدت 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 کاملاً خشک شوند. در مرحله بعد سرم هر یک از مرغ‌های دو گروه با رقت‌های مختلف از یک به ۵۰۰ تا یک به ۶۴۰,۰۰۰ 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

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 ایمونوکروماتوگرافی، تشخیص سریع این باکتری را فراهم می‌کند. 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 ویبریولرای 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 ارگانیزم 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 ایمونواسی شامل الایزا و آگلوتیناسیون و روش‌های مبتنی بر DNA مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و هیبریداسیون اشاره کرد(۱۰۶). با آن که تست‌های مبتنی بر DNA نسبت به ایمونواسی حساسیت بالاتری دارند اما روش‌های ایمونواسی 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 فاز CTXφ تولید می‌شود. ژنوم این فاز شامل ده ژن است که تمامی این ژن‌ها به‌جز ctxA و ctxB، برای همانندسازی، اینترگراسیون، ترشح و بسته‌بندی فاز حیاتی هستند. پروتئین‌های CtxA و CtxB در چرخه زندگی فاز نقش ضروری نداشته و کدکننده توکسین هستند. فازهای CTXφ موجود در سویه‌های کلاسیک و التور از لحاظ توالی ژن rstR⁺ به طور کامل متفاوتند اما در سایر ژن‌های این فاز تنها پلی‌مریسم‌های تک‌نوکلئوتیدی مشاهده شده است(۱۱). در ارزیابی‌هایی که در زمینه اختصاصی بودن این بیومارکر برای تشخیص سویه‌های سم‌زا انجام شده، مناسب بودن آنتی‌بادی ضد CtxB تایید شده است(۸، ۶).

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 ویبریولرا شد تا توسط آن با بهره‌گیری از ویژگی‌های منحصربه‌فرد این نوع آنتی‌بادی، امکان راه‌اندازی یک روش ایمونواسی 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 (ایناپا) (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) 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: aaaggatccATTAAATTTGGTG / R ctxB: aatctcgagTTAATTGGCCATACTAATTG

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دو میکرولیتر DNA ژنومی ویبریولرا با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، دو میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰

و حدود ۱۰۶ باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط کشت داده شد. لوله‌ها به مدت چهار ساعت به صورت ثابت در انکوباتور قرار گرفتند و پس از آن محتویات لوله‌ها به فلاسک‌های ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ساعت در حال حرکت دورانی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. تمام مراحل انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. سپس محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه و با نیروی ۱۴۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه 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 به صورت دوتایی به چاهک‌های میکروپلیت الایزا افزوده شد. پلیت به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شد تا آنتی‌ژنها به طور کامل کف چاهک‌ها را بپوشانند. پس از چهار مرتبه شست و شو 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 شد و میکروپلیتها به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از چهار بار شست و شو 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 شست و شو داده شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB داخل هر چاهک ریخته شد. پلیتها بلافاصله به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی 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) و حد تشخیص (LOD) 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 به صورت دوتایی به چاهک‌ها اضافه شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از چهار مرتبه شست و شو مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی IgY ضد CtxB کونجوگه با آنزیم HRP با رقت یک به ۶٫۴۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد. تعداد ۲۰ چاهک از پلیت نیز به عنوان 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 شست و شو، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB داخل هر چاهک ریخته شد. پس از ۱۵ دقیقه 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 ۲۰ چاهک مربوط به بلانک تعیین و مقادیر LOB و جذب نوری LOD با استفاده از معادلات زیر محاسبه شد (۱۵-۱۶):

$$LOB = \text{Mean}_{\text{Blank}} + 1.645(\text{SD}_{\text{Blank}})$$

$$Ab_{LOD} = \text{Mean}_{\text{Blank}} + 3(\text{SD}_{\text{Blank}})$$

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

Limit of Blank 4

Limit of Detection 5

به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از چهار بار شست و شو و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌زا واکنش رنگی به مدت 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 تیتراژ 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 آنتی‌بادی 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 لانس به آرامی پوسته روی زرده پاره شد تا محتویات زرده داخل یک فالدون تخلیه شد. زرده تخم‌مرغ با PBS به اندازه دو برابر حجم خود به طور کامل 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 ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با نیروی 13000xg 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 به انجام رسید. این بار رسوب باقی‌مانده به آرامی در یک میلی‌لیتر PBS حل و سپس با PBS به حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به آن ۱۲ درصد PEG ۶۰۰۰ اضافه شد و مانند مراحل قبل تشکیل دو فاز و سانتریفیوژ به انجام 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 به مدت سه ساعت ادامه یافت. غلظت پروتئین تخلیص‌یافته با روش Bradford و خلوص آن با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریلامید 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) در ۱۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده و سپس ۱۵۰ میکرولیتر سدیم پریودیت ۰/۱ مولار اندک اندک به محلول اضافه شد. این محلول به مدت 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 بافر استات سدیم یک میلی‌مولار با pH ۴٫۴ به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز و طی این مدت سه بار بافر تعویض شد. محلولی با غلظت ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بادی تهیه و با بافر کربنات-بی‌کربنات ۰/۵ مولار pH ۹٫۵ دیالیز شد. ۵۰۰ میکرولیتر از آن با آنزیم فعال‌شده HRP به مدت دوساعت در حال چرخش آهسته مجاور شدند. در نهایت برای پایان دادن به واکنش، میزان ۴۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم بورهیدرات با غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به آرامی به محلول حاوی پروتئین و آنزیم اضافه به مدت یک ساعت انکوبه شد. این محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در برابر بافر PBS و با سه‌بار تعویض بافر دیالیز شد. اینتگرال کنجوگه با HRP در محلول ۰ درصد گلیسرول و BSA (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مخلوط و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

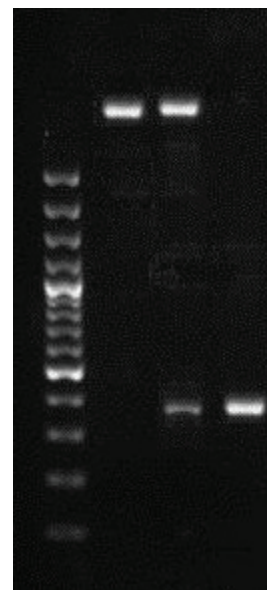
بهینه‌سازی روش الایزای ساندویچ برای تشخیص پروتئین CtxB

برای انجام این کار از سوپرناتانت کشت ویبریوکلرا سویه O1 (اینا) (PTCC No: ۱۶۱۱) و (PTCC No: Escherichia coli ۱۳۹۵) به عنوان 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 NaHCO_3) به لوله‌های آزمایش با نسبت سطح به حجم کم (ارتفاع ۱۵۰ میلی‌متر و قطر ۱۵ میلی‌متر) منتقل

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

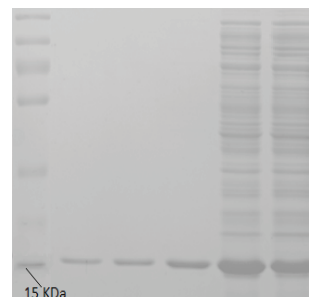
یافته‌ها:

تکثیر، کلونینگ و بیان ژن ctxB و تخلیص پروتئین نوترکیب حاصله
تکثیر ژن ctxB با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به ایجاد محصولی ۳۹۰ جفت‌بازی منجر شد. ترانسفرماسیون محصول لیگاسیون ژن فوق با وکتور بیانی pET28a به باکتری E.coli سویه DH5 α 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 به این 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

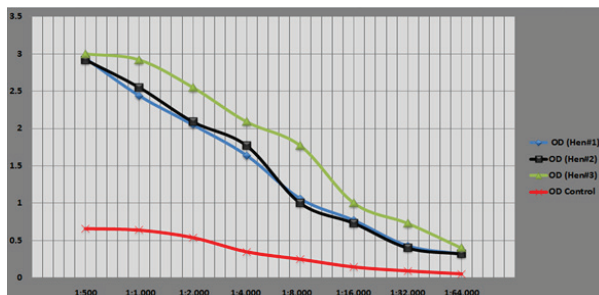
الکتروفورز باکتری BL21 (DE3) القایافته حاوی pETctxB وجود باند پروتئینی با سایز ۱۷ کیلوالتون را که معادل سایز محاسبه شده برای پروتئین نوترکیب CtxB بود، اثبات کرد. تخلیص پروتئین حاوی دنباله هیستیدینی با استفاده از رزین نیکل به تولید پروتئینی با خلوص بیش از ۹۵ درصد بر اساس SDS-PAGE منجر شد (شکل ۲) و میزان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

تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده در مرغ‌های ایمونیزه با CtxB نوترکیب

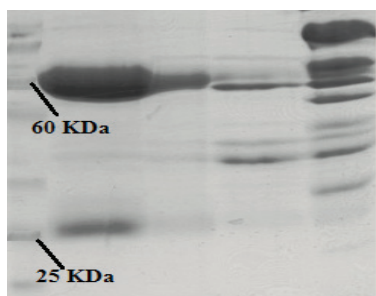
بررسی میزان آنتی‌سرم در مرغ‌های ایمونیزه شده و نیز گروه شاهد انجام شد. نمودار نتایج آزمون الایزا در نمودار شماره ۱ قابل مشاهده است. تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده در مرغ‌های ایمونیزه معادل یک به ۳۲,۰۰۰ بود. مرغ شماره ۳، بیشترین تیتراژ آنتی‌بادی ضد CtxB را تولید کرد و بنابراین در مرحله بعدی از تخم‌های این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



نمودار ۱. تیتراژسرو 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 زرده 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 پلی‌آکریل‌امید انجام شد. این بررسی نشان داد، هر چه مراحل تخلیص پیشتر می‌رود، خلوص آنتی‌بادی بالاتر رفته به طوری که در ستون مربوط به IgY خالص، دو باند قطور با اندازه‌های ۶۰ و ۲۵ کیلوالتون که به ترتیب نشان دهنده دو زنجیره سنگین و سبک آنتی‌بادی است، دیده می‌شود (شکل ۳). متوسط میزان آنتی‌بادی تخلیص‌یافته از هر تخم‌مرغ ۵۰/۹ میلی گرم 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 خالص پس از اضافه کردن PEG 5/3، ستون ۳. IgY نیمه‌خالص پس از اضافه کردن PEG 5/3، ستون ۴. IgY خالص، ستون ۵. مارکر وزن ملکولی پروتئین

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

بر اساس نتیجه حاصل از فرآیند بهینه‌سازی، میزان مناسب آنتی‌بادی α -CtxB برای پوشش‌دهی میکروپلیت‌های الایزا ۵ میکروگرم بر میلی لیتر 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 ۸ درصد 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

پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شد. PEG به طور کامل پودر شده 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 به صورت پودر شده باعث تماس بهتر آن با زرده تخم مرغ می‌شود. تمام این موارد سبب شد که IgY به مقدار بیشتر و با خلوص بهتر از زرده تخم مرغ جدا

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 به دست آمده از این آزمایش در جدول شماره ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱. نتایج مربوط به محاسبه حساسیت آنالیتیکی روش الایزای تنظیم شده

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 به صورت اندمیک درگیر این بیماری هستند، به دلیل گسترش سریع و ایجاد اپیدمی‌های وسیع، بار اقتصادی سنگینی ایجاد می‌کند. این بیماری در حال حاضر در آفریقا، جنوب و شرق آسیا به صورت اندمیک به چشم می‌خورد (۱۷). در سال‌های اخیر موارد گزارش شده وبا به تدریج افزایش یافته، به طوری که 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 به موقع شیوع وبا در مراحل آغازین، می‌توان بیماری را با هدف کاهش تعداد مبتلایان و دوره درگیری به نحو مؤثری تحت کنترل درآورد. به همین دلیل به کارگیری 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 طور عمده به دلیل خوردن آب و مواد غذایی آلوده انجام می‌شود 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 کارایی آنتی‌بادی تولید شده با روش الایزای ساندویچ ارزیابی شد. برای رسیدن به این هدف اقدام به طراحی و راه‌اندازی روش الایزای ساندویچ بر اساس آنتی‌ژن CtxB ویبریولرا شد. براساس بررسی‌های انجام شده تا کنون، این اولین موردی است که در آن آنتی‌بادی‌های IgY برای تشخیص ویبریولرا 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 ۱۸ برابر 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 ارائه شده تسهیل می‌کند.

تاکنون روش‌های مختلفی برای جداسازی و تخلیص IgY از زرده تخم مرغ توصیف شده است، این روش‌ها به سه دسته کلی تهنشین‌سازی، کروماتوگرافی و اوترافیلتراسیون تقسیم می‌شوند (۲۶). در این مطالعه از روش تهنشین‌سازی با

شد. بازده IgY تخلیص شده در مطالعه‌های مختلف بسیار متفاوت است. در بررسی انجام شده توسط Pauly و همکارانش، توانستند تا میزان ۶۰ میلی گرم IgY را از هر تخم مرغ 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 میلی گرم به ازای هر تخم مرغ گزارش شده است (۸). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ برای تولید IgY علیه آنتی‌ژن‌های محلول توکسین پلاسما گوندی انجام شده است، محققان توانستند ۴۸ میلی گرم آنتی‌بادی مرغی خالص از هر تخم مرغ تولید کنند (۲۸). در همین سال گروه دیگری به تولید آنتی‌بادی مرغی علیه ویروس غیرفعال شده انفلوانزای B اقدام کردند، در این بررسی برای تخلیص آنتی‌بادی‌ها از پلی‌اتیلن گلیکول استفاده شد و توانستند ۷۶/۵ میلی گرم آنتی‌بادی از هر تخم مرغ تولید کنند (۲۹). در بررسی انجام شده در این پژوهش میزان آنتی‌بادی خالص به دست آمده علیه معادل ۵۰/۹ میلی گرم به ازای هر تخم مرغ است که در نتایج حاصل از بررسی‌های ذکر شده مشابه از بازده قابل قبولی برخوردار است.

در الایزای طراحی شده در این مطالعه، میزان حساسیت آنالیتیکی معادل ۳۳ پیکوگرم بر میلی لیتر CtxB برآورد شد. روش‌های بسیاری برای تشخیص سم وبا با حساسیت‌های مختلف طراحی شده‌اند. در متد ارائه شده توسط Ngundi و همکاران که یک روش مبتنی بر منوساکارید است حداقل میزان تشخیص سم وبا ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی لیتر 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 میلی لیتر رسانده‌اند (۳۱). همچنین در یک روش ایمونواسی مبتنی بر هیدروژل که در سال ۲۰۰۶ توسط Charles و همکارانش معرفی شد، محدوده تشخیصی سم کلرا به یک نانوگرم بر میلی لیتر ارتقا یافت (۳۲). از طرفی در روش الایزای طراحی شده 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 میلی لیتر 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 پلی کلونال خرگوشی علیه CtxB به عنوان آنتی‌بادی‌های تسخیری و از آنتی‌بادی منوکلنال تولید شده علیه همین آنتی‌ژن به عنوان آنتی‌بادی شناساگر استفاده شد. حساسیت آنالیتیکال این روش معادل ۶۰ پیکوگرم بر میلی لیتر برای CtxB گزارش شده است (۶). همچنین در پژوهش دیگری که در آن به طراحی و ارزیابی یک روش ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص پروتئین کامل سیتوتوکسین وبا پرداخته شده، حد تشخیصی روش ۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر گزارش شده است (۷).

در پژوهش حاضر برای دستیابی به روشی با حساسیت بالا، به بهینه‌سازی تست الایزا با استفاده از تیتراسیون شطرنجی ۶ پرداخته شد. با این رویکرد میزان بهینه برای پوشش دهی و رقت آنتی‌بادی کنجوجه مورد نیاز به دقت 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 تهیه شده با محلول حاوی CtxB نو ترکیب استفاده شد و با توجه به محدوده تشخیصی برآورد شده می‌توان گفت که حساسیت این روش در

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 طراحی شده است، به‌ویژه آن که توالی کلرا توکسین حدود ۸۰ درصد با سم حساس به حرارت تولیدشده توسط *enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) شباهت دارد (۳۵). با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز تست الایزای طراحی شده با آنتی‌بادی مرعی حاصله، در نظر داریم در آینده ارزیابی‌های دقیق‌تری از این روش به انجام برسانیم.

در این پژوهش به تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال مرعی 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 مرعی 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 می‌شود.

مقایسه با روش‌های تشخیصی مشابه که پیش‌تر به آنها اشاره شد، بالاتر است. یک دلیل این برتری می‌تواند استفاده از آنتی‌بادی‌های مرعی 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 کارایی 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 کارایی این روش

منابع:

- Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera: a great global concern. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2011;4(7):573-80.
- 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.
- 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.
- 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.
- Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*, Chapter 6. LABORATORY IDENTIFICATION OF *VIBRIO CHOLERAE* Centers for Disease Control and Prevention p. 38-67.
- 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.
- 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.
- JP Yadava MJAG. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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).
- Wisdom GB. Horseradish Peroxidase Labeling of IgG Antibody. The Protein Protocols Handbook: Springer; 2002. p. 347-8.
- 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.
- David A Armbruster TP. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. Clin Biochem Rev. 2008;29.
- 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).
- 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).
- 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.
- Michal H. Dick MG, Francis Moussy, Claire-Lise Chagnat. Review of Two Decades of Cholera Diagnostics – How Far Have We Really Come? PLOS Neglected Tropical Diseases. 2012;6(10).
- Meng J, Doyle M. Emerging issues in microbiological food safety. Annual review of nutrition. 1997;17(1):255-75.
- 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.
- Notermans S, Wernars K. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. International journal of food

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, McMurphy 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. Charles 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.