Archive of SID

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، علمی ـ پژوهشی، سال هفدهم، تابستان، شماره ۲، ۱۳۹۹، ۳۲۰۲-۳۱۹۳

# طراحی کیت دات الایزا در جهت تشخیص آنتروتوکسین های *(SEA)* باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و مقایسه آن با روش ساندویچ الایزا، تعیین صحت تشخیص آن در نمونه نان‌های خامه‌ایی

سارا السادات بطحایی [۱]، حامد اهری [۲] ، سیدامیرعلی انوار[۳*]

## چکیده

در این مطالعه تشخیص و شناسایی آنتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس به کمک طراحی کیت حساس Dot ELISA انجام شده است. در این مطالعه از کاغذهای نیتروسلولزی با منافذ ۰/۲۲ میکرون به‌عنوان بستر استفاده شده است، بر روی بستر یاد شده آنتی‌بادی اختصاصی آنتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس با رقت۱/۵۰۰ کوت گردیده و سپس توکسین اختصاصی به آنتی‌بادی‌های چسبیده شده مجاورت داده شده است؛ در ادامه آنتی‌بادی نشان‌دار شده با آنزیم HRP با رقت ۱/۲۰۰۰ اضافه گردیده، باگذشت زمان و شستشوی مجدد، سوبسترا اضافه شد؛ در این آزمایش نمونه‌ها به‌صورت دستی آلوده شده و سپس با روش ساندویچ الایزا به عنوان استاندارد طلایی مورد مقایسه قرار گرفت، این کیت قادر به تشخیص ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به بالا توکسین A بوده و چنانچه میزان توکسین کمتر از این مقدار باشد آن را به‌صورت منفی گزارش کرده، در این آزمایش از ٤٠ نمونه جمع‌آوری‌شده، ٤ نمونه مثبت گزارش‌شده، نشان می‌دهد که حدود ۱۰ ٪ نمونه‌های جمع‌آوری‌شده آلوده بوده است؛ امروزه با استفاده از کیت الایزا دات به‌عنوان روش سریع با حساسیت و ویژگی نسبی، می‌توان تکرارپذیری جهت تشخیص آنتروتوکسین A استافیلوکوکوس در نان‌های خامه‌ایی را بهبود بخشید.

***واژگان کلیدی کیت دات الایزا، استافیلوکوکوس اورئوس، آنتروتوکسین.***

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۰

## مقدمه

امروزه بیماری‌های ناشی از غذا یکی از شایع‌ترین مشکلات بهداشتی و تغذیه‌ای در جهان است، این بیماری‌ها از طرف سازمان بهداشت جهانی به‌عنوان بیماری‌های ناشی از مواد آلوده‌کننده یا سمی که با مصرف غذا و آب ایجاد می‌گردد، اعلام‌شده است(۱). مسمومیت استافیلوکوکی در بسیاری از کشورها در یکی از جایگاه‌های اول تا سوم قرار دارد، به عنوان مثال در کشور فرانسه بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۰ بعد از باکتری سالمونلا، دومین عامل مسمومیت ناشی از مصرف غذا بوده، همچنین در آمریکا بعد از کلستریدیوم پرفریژنز و سالمونلا، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مهم‌ترین عامل بیماری و مسمومیت ناشی از مصرف غذا شناخته شده است(۲). برخلاف خود باکتری، آنتروتوکسین ترشح‌شده توسط آن در شرایط نامساعد نسبتاً پایدار است(۳).

استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل طیف گسترده ایی از عفونت‌ها که در انسان و گونه‌های مختلفی از حیوانات که به وجود می‌آورد مورد توجه است؛ استافیلوکوکوس اورئوس جز عوامل بیماری‌زایی تولید سم در غذا شناخته می‌شود به همین دلیل به آن‌ها SFP (Staphylococcal food poisoning) یعنی مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی گفته می‌شود که تولید انتروتوکسین آن در غذاها بخصوص فرآورده‌های گوشتی و لبنی بیشتر است؛ انتروتوکسین های استافیلوکوکوس از پروتئین‌های تک زنجیره‌ای با میانگیر وزن مولکولی بین ۲۷ تا ۳٤ KDa (کیلودالتون) است (٤).

آنتروتوکسین های استافیلوکوکی جز خانواده توکسین های بیماری‌زا به‌حساب می‌آید که از (A تا E) دسته‌بندی می‌شود که این دوازده گونه از آنتروتوکسین های مختلف توسط گونه استافیلوکوکوس اورئوس ترشح می‌شود، آنتروتوکسین A سمی‌ترین نوع و شایع‌ترین عامل وقوع مسمومیت غذایی استافیلوکوکی است(۵).

علی‌رغم بررسی تحقیقات صورت پذیرفته برای تشخیص توکسین ها، با این حال نیاز به بررسی بیشتر درزمینه تشخیص

۱. کارشناس ارشد دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۲. دانشیار دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
* گروه علوم پایه و بهداشت دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران: (saaa4824@gmail.com)



www.SID.ir

Archive of SID



SEA در مواد غذایی آن‌هم به روش سریع وجود دارد؛ تست الیزا روش بسیار حساسی است که معمولاً برای جستجوی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی بکار می رود، در این راستا تحقیق حاضر با ۱۲هدف طراحی کیت Dot ELISA در جهت تشخیص آنتروتوکسین های SEA باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و تعیین صحت تشخیص آن در نمونه نان‌های خامه‌ایی انجام‌گرفته و درنهایت برای تائید آزمون, داده‌های به‌دست‌آمده از روش الایزا دات با روش الایزا ساندویچ مقایسه شده است.

## مواد و روش‌کار

در مجموع ٤٠ نمونه شیرینی خامه‌ایی جمع‌آوری‌شده از قنادی‌های منطقه ۵ شهر تهران به‌صورت تصادفی در شرایط و زمان مناسب به آزمایشگاه منتقل گردیده و از کاغذ نیتروسلولزی ( Bio-Rad) به‌عنوان بستر در پلیت های الایزا ایرانی قرار داده شد و آنتی‌بادی اولیه SEA مارک Sigma-Aldrich، بووین سرم آلبومین (BSA) مارک Sigma-Aldrich به‌عنوان بلاک کننده و آنتروتوکسین A استافیلوکوکوس اورئوس مارک Sigma-Aldrich جهت تست با بافر و ایجاد آلودگی دستی، آنتی‌بادی کنژوگه A، فسفات بافر سالین(PBS)، آب یونیزه (H2ODD) مارک Farming Intelligene Tech و تترامتیل بنزیدین (TMB) مارک پادتن علم تهیه شده و برای ساخت کیت ساندویچ الایزا استفاده گردید.

### مرحله coating

در مرحله coatingیک فاز جامد که می‌تواند آگار، سلولز، پلی ونیل کلراید، پلی اکریل آمید، پلی استرین، ورقه‌های نیترو سلولزی باشد، استفاده شد؛ آنتی‌بادی اول به نسبت‌های مختلف با بافر کربنات رقیق‌شده و روی ورقه‌ها ریخته شد، بهترین جواب از بین رقت‌های انتخاب و یک ساعت برای کوت زمان داده شد.

### مرحله : blocking

پس از گذشت یک ساعت محتویات چاهک خالی گردیده، گذشت این زمان ضروری است تا آنتی‌بادی‌های قرار داده شده بر روی صفحات بچسبند؛ در این مرحله آنتی‌بادی‌ها همه‌جا را ممکن است پر نکرده و یک سری مناطق خالی مانده لذا در این مرحله عمل ceal شدن صورت بپذیرد، این عمل توسط موادی مانند Bovine Serum Albumin (BSA) فاقد پروتئاز بایستی استفاده گردد؛ زیرا اگر بلاک کننده حاوی پروتئاز باشد، آنتی‌بادی‌ها را لیز نموده و اختلال در عملکرد ایجاد می‌نماید؛ رقیق‌سازی از ۱ تا ۱۰ درصد انجام شده و برتری بهترین رقت بلاک جهت پر کردن فواصل بین آنتی‌بادی‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

### افزودن آنتی‌ژن

آنتی‌ژن‌ها (آنتروتوکسین) استافیلوکوکوس اورئوس در بافر با رقت‌های مختلف آماده‌شده و به‌اندازه ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه نموده شد، لازم به ذکر است در جلسات مختلف رقت‌های پایین‌تر و بالاتر از این رقت‌ها را تست‌شده و بهترین رقت‌ها را انتخاب گردید، یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد، سپس با محلول Washing که به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق‌شده و دارای مواد دترجنت، توئین ۲۰ و نمک طعام برای تنظیم PH است عمل شستشو را انجام داده، به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از محلول به گودهها اضافه و ۲ تا ۳ دقیقه زمان داده شد و آنتی‌ژن‌هایی که به آنتی‌بادی متصل نشده خارج گردیده است. در الایزا مراحل نمونه برداری و شستشو بسیار مهم بوده پس بهتر است عمل شستشو ۵ بار تکرار گردد.

### مرحله اضافه کردن آنتی‌بادی کونژوگه

آنتی‌بادی کونژوگه با HRP (Horsradish peroxidase) رقیق‌کننده به نسبت‌های مختلف رقیق شد، به درون گودهها



www.SID.ir

Archive of SID



اضافه گردید و لازم به ذکر است که برای رسیدن به بهترین رقت به تعداد دفعات رقت‌های مختلف تست‌شده، تا بهترین پاسخ دریافت گردد. ماده رقیق‌کننده PBS(Phosphat buffer salin) با ترکیب NAOH 1/0 نرمال با BSA 15/0 گرم در هر میلی‌لیتر بوده که نقش افزایش پایداری را داشته، حال پس از اضافه کردن آنتی‌بادی کونژوکه به چاهک‌ها، اجازه داده تا یک ساعت در دمای اتاق نگهداری گردد.

**مرحله شستشو**

مرحله بعدی مرحله شستشو بوده که با محلولی که حاوی ماده توئین عمل شستشو ۵ بار صورت پذیرفت، که در آنتی‌بادی‌های کونژوکه ای که به آنتی‌ژن متصل نشده بودند جدا و درنهایت شسته شدند، از فاکتورهای تأثیرگذار بر طراحی الایزا دات دمای آزمایشگاه بوده، بطوریکه هر چه دما پایین‌تر باشد زمان انکوباسیون‌ها افزایش‌یافته، بهترین دما حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده پس کنترل دما بسیار حائز اهمیت است.

**اضافه کردن محلول سوبسترا :Substrate Reagent**

در این مرحله سوبسترا با قسمت فعال آنزیم باند شده و باعث ایجاد تغییر رنگ می‌گردد، در این خصوص می‌توان به میزان ۱۰۰–۱۰ میکرولیتر از TMB(Tetra methyle benzidin) و OPD (O-phenylediamine) را استفاده نموده، در این مرحله آنتی‌بادی کونژوگه،TMB را به یک محصول رنگی تبدیل کرده که هر چه این آنتی‌بادی بیشتر باشد TMB بیشتر به آبی میل می‌نماید، TMB دو نوع A و B دارد که از هر دو نوع به نسبت مساوی مخلوط شده و حدوداً چند دقیقه زمان لازم که بسته به‌سرعت آبی شدن متغیر بوده است.

**خواندن نمونه‌ها**

مشاهده لکه‌ی رنگی آبی نشان‌دهنده حضور آنتروتوکسین و عدم حضور لکه‌ی رنگی آبی نشان‌دهنده عدم حضور آنتروتوکسین بوده، از مزیت‌های این روش کنترل بصری آن است که استفاده از آن را راحت کرده است(٦،٧). کاغذهای نیتروسلولز به ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع برش خورده و در پلیت ٢٤ خانه ایی الایزا قرار داده شد، آنتی‌بادی SEA به میزان ۳ میکرولیتر با رقت ۱/۵۰۰ کوت گردیده و پس از طی مدت نیم ساعت خشک گردید (۸). بعد از خشک شدن آنتی‌بادی بر روی کاغذها, بلاک کننده‌ی BSA 3 % که با PBS رقیق‌شده بوده اضافه گردیده و بعد از گذشت ۱ ساعت چاهک‌ها یک‌بار با PBS شسته شده(۹). به چاهک‌های کنترل مثبت آنتروتوکسین با غلظت 50 ng/ml به میزان ۳۰۰ میکرولیتر و به چاهک‌های کنترل منفی, PBS به همان میزان اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق باقی‌مانده تا اتصالات صورت گرفته، در آزمون نمونه‌ها، ابتدا از نان‌های خامه‌ایی ابتدا به هر میکروتیوب ۰/۱ گرم ریخته شد و به میزان ۱ میلی‌لیتر به آن‌ها آب اضافه گردید و با vortex به‌خوبی یکنواخت شد سپس نمونه ها را داخل سانترفیوژ قرار داده تا چربی خامه، روی سطح قرارگرفته، ۵۰۰ میکرولیتر از قسمت فاقد چربی به گوده‌ها اضافه گردید و بعد از کوت کردن نمونه‌ها در چاهک‌ها, نمونه به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا فرایند کوتینگ به‌خوبی صورت گرفته سپس تمام چاهک‌ها دو بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با بافر شسته شده است(۸،۹). آنتی‌بادی کنژوگه رقیق‌شده حاوی BSA با رقت ۱/۲۰۰۰ به میزان ۳۰۰ میکرولیتر آماده و بر روی گوده‌ها ریخته شده و مجدداً پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرارگرفته است(۸،۹). همه‌ی چاهک‌ها دو بار با Wash buffer به‌سرعت شسته شده و کاغذها با پنس بر روی کاغذ معمولی انتقال یافت و در مدت زمان سی دقیقه به‌خوبی خشک شد(۸،۹).



www.SID.ir

Archive of SID



جدول ۱- میزان جذب آنتی‌بادی کنژوگه در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر

| میزان آنتی‌بادی دوم | میزان جذب ۱ | میزان جذب ۲ | میزان جذب ۳ |
|---|---|---|---|
| ۱/۲۰۰۰ | ۱/۸۹۷ | ۱/۷۳۳ | ۱/۶۷۸ |
| ۱/۴۰۰۰ | ۰/۸۵۸ | ۰/۷۹۹ | ۰/۷۹۵ |
| ۱/۸۰۰۰ | ۰/۳۴۸ | ۰/۳۴۲ | ۰/۳۵۵ |
| ۱/۱۶۰۰۰ | ۰/۰۹۵ | ۰/۰۹۱ | ۰/۰۸۸ |
| ۱/۳۲۰۰۰ | ۰/۰۶۷ | ۰/۰۶۱ | ۰/۰۶۳ |
| ۱/۶۴۰۰۰ | ۰/۰۲۳ | ۰/۰۲۱ | ۰/۰۲۶ |
| ۱/۲۵۶۰۰۰ | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۱۲ | ۰/۰۱۴ |

جدول ۲-میزان جذب توکسین با روش الایزا و مقایسه آن با نتایج حاصل از دات الایزا

| توکسین | جذب در ۴۵۰ نانومتر الایزا | نتایج حاصل از کیت الایزا دات |
|---|---|---|
| ۱۰۰ | ۰/۹۳ ± ۰/۸۷۳ | آبی |
| ۵۰ | ۰/۵۶۴ ± ۰/۳۳ | آبی |
| ۲۵ | ۰/۴۲۹ ± ۰/۶۵ | بی‌رنگ |
| ۱۲/۵ | ۰/۳۲۶ ± ۰/۵۲ | بی‌رنگ |
| ۰ | ۰/۳۴۸ ± ۰/۱۵ | بی‌رنگ |

بعد از خشک شدن کامل, TMB به میزان ۲۰ میکرولیتر بر روی تمام کاغذها ریخته شده است. بعد از گذشت مدت زمان ۱۰ دقیقه تغییر رنگ کاغذها به‌خوبی نمایان گردید و کنترل مثبت‌ها، آبی‌رنگ و کنترل منفی‌ها، سفید رنگ باقی‌مانده، برای

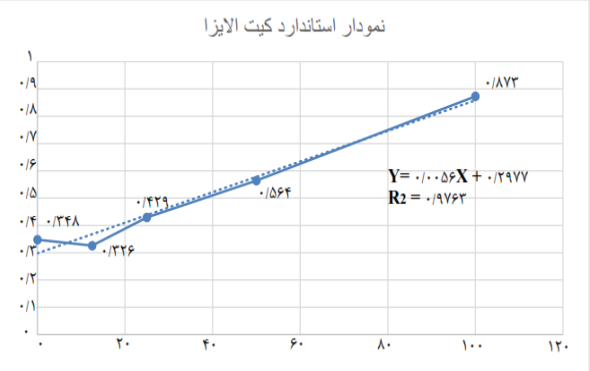


www.SID.ir

Archive of SID



نمونه‌های مورد آزمایش، از ٤٠ نمونه ٤ نمونه آبی‌رنگ شد که نتایج حاصله با الایزا ساندویچ مقایسه گردید که در ادامه به‌طور مفصل به آن پرداخته شده است(٨،٩). طبق دستور عمل در بروشور شرکت سیگما آنتی‌بادی اول خریداری شد؛ که میزان مناسب برای روش الایزا و وسترن بلات ١/٢٠٠٠ ذکرشده است؛ به همین منظور از همین غلظت برای کوت آنتی‌بادی اول در روش الایزا استفاده شد اما میزان مناسب مورد استفاده در روش دات الایزا١/٥٠٠ بوده؛ میزان جذب توکسین حاصل از ٣ تکرار، ثبت گردیده است. سپس نمودار کیت الایزای طراحی‌شده در شکل نشان داده شده, براساس معادله‌ی به‌دست‌آمده از منحنی $R^2$ برابر ٠/٩٠٢٥ شده است:




نمودار ١: نمودار استاندارد کیت الایزا

$Y= ٠/٠٠٥۶X+ ٠/٢٩٧٧$

$R^2 =٠/٩٧۶٣$

y در معادله فوق برابر با میزان جذب آنتروتوکسین A در طول‌موج ٤٥٠ نانومتر در نمونه‌ی استاندارد و x غلظت آنتروتوکسین بوده، کیت دات الایزا طراحی‌شده بعد از گذشت یک ماه مجدداً طراحی گردید تا تکرارپذیری آن مورد بررسی قرار گیرد طبق مشاهدات، نتایج مقایسه با روش الایزا ساندویچ نتایج مانند جدول ٢ بوده است.

با بررسی نتایج آمار توصیفی به‌دست‌آمده نشان داده شده که کیت دارای دو رنگ آبی و سفید است، غلظت‌های استاندارد خوانده شده با الایزا ساندویچ برای کیت سفید دارای کمینه ٠ نانوگرم، بیشینه ٥٠ نانوگرم و برای کیت آبی دارای کمینه ٥٠ نانوگرم، بیشینه ١٠٠ نانوگرم بوده است, نتایج به‌دست‌آمده از الایزا ساندویچ با جدول و نمودار استاندارد کیت دات الایزا (جدول ٢) مطابقت داده شد و مشاهده گردید بیشترین میزان میانگین غلظت سم آنتروتوکسین در نمونه نان خامه‌ای که باعث تغییر رنگ کیت دات الایزا گردیده، در گروه غلظت استاندارد ng/ml ١٠٠ قرار داشته و با مقایسه با نمونه‌ها توسط الایزا ساندویچ دارای این میانگین (SD=٣/٢٨) (AVG= ٩٠/١١) بوده، به همین ترتیب کمترین میزان میانگین غلظت سم آنتروتوکسین در نمونه نان خامه‌ای که باعث تغییر رنگ کیت دات الایزا نگردیده است، در گروه غلظت استاندارد ng/ml ٠ قرار داشته و با مقایسه با نمونه‌ها توسط الایزا ساندویچ دارای این میانگین(SD=٠/٧٣)، (Avg. =٥/٢٨) بوده است.

به‌منظور تحلیل بیشتر و به دست آوردن نتیجه آماری قابل استناد مبنی بر مؤثر بودن کیت طراحی‌شده دات الایزا در تشخیص سم آنتروتوکسین در غلظت‌های مختلف، اقدام به انجام آزمون آنالیز واریانس یک متغیره، با استفاده از داده‌های خام موجود گردید (جدول ٤). نتایج تحلیل آماری به‌عمل‌آمده نشان می‌دهد، به لحاظ آماری، کیت طراحی‌شده دات الایزا توان تشخیص سم آنتروتوکسین موجود در نمونه‌های نان خامه‌ای در غلظت‌های ٥٠ و ١٠٠ نانوگرم بر میلی‌لیتر را دارد (F=٦٠/٨٤٠)، (α=٠/٠٠). همچنین با بررسی بیشتر جداول (٤) و (٥) مشاهده گردیده است، نمودار استاندارد طراحی‌شده کیت دات الایزا نمودار (١) و



www.SID.ir

Archive of SID



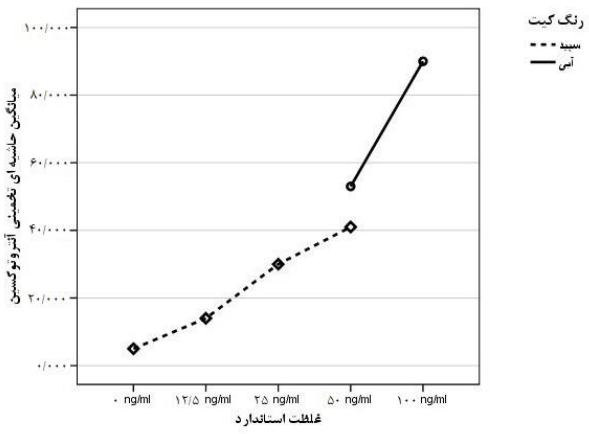
جدول ۴- جدول آنالیز واریانس

**متغیر وابسته:** غلظت بر حسب ng/ml

| مبدأ آماری | درجه آزادی | F | Sig. |
|---|---|---|---|
| رنگ کیت دات الایزا | ۱ | ۶۰/۸۴۰ | /۰۰۰ |
| غلظت استاندارد | ۴ | ۶۸۹/۴۱۵ | /۰۰۰ |

جدول ۵- غلظت استاندارد آنتروتوکسین

| | | غلظت استاندارد آنتروتوکسین | تعداد | میانگین گروه استاندارد غلظت | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ |
| آزمون HSD[a] | Tukey | ng/ml۰ | ۲۲ | ۵/۲۷۹۰۹ | | | | |
| | | ng/ml۱۲/۵ | ۳ | | ۱۴/۳۷۸۹۷ | | | |
| | | ng/ml۲۵ | ۶ | | | ۳۰/۲۱۲۳۰ | | |
| | | ng/ml۵۰ | ۷ | | | | ۴۵/۱۷۲۶۲ | |
| | | ng/ml۱۰۰ | ۲ | | | | | ۹۰/۱۱۳۱۰ |




نمودار۲- میانگین حاشیه ای تخمینی غلظت آنتروتوکسین

**بحث**

Kuang و همکاران در سال ۲۰۱۳ روی پادتنی به روش ساندویچ الایزا برای شناسایی آنتروتوکسین A استافیلوکوکوس مطالعاتی انجام داده‌اند که این مطالعات به‌طور قانونی و رسمی در جیانیانگ ژاپن مورد بررسی قرارگرفته و بعد از انجام مراحل روتین و انتخاب ۱۰ پادتن بسیار نزدیک ازنظر خانوادگی به آنتروتوکسین A ، آزمایش‌هایی به انجام رسید؛ متدی که برای آن محدوده جنبشی به‌صورت خطی و محدوده شناسایی در نظر گرفته



www.SID.ir

Archive of SID



شد و مقداری که یافت شد به ترتیب حدود ۰/۰۲۸۲ و ۰/۰۶ تا ng/ml ۲ بود، واکنش‌پذیری در اینجا با آنتروتوکسین B، C، D و E بسیار ناچیز بود، آن‌ها به این نتیجه رسیده‌اند که روش ساندویچ الایزا برای شناسایی آنتروتوکسین A بسیار مؤثر بوده است در راستای تحقیق مذکور نشان داده که انتخاب روش الایزا ساندویچ به‌عنوان گلد استاندارد بسیار مناسب است(10).

Hassani و همکاران در سال ۲۰۱٤ به مسدود کردن ژن آنتروتوکسین A در *استافیلوکوکوس اورئوس* موجود در محصولات لبنی سنتی در تهران اقدام کرده‌اند، هدف از این مطالعه جداسازی آنتروتوکسین A تولید شده از *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که به روش PCR صورت گرفته بود نشان داد که این روش یک روش سریع و حساس برای تشخیص آنتروتوکسین ها نبوده و برخلاف تحقیقات مذکور روش الایزا دات روش بسیار سریع‌تری بوده بنابراین ازنظر زمانی و هزینه بسیار مقرون‌به‌صرفه است(6).

Nagaraj و همکاران در سال ۲۰۱٦ بر روی شناسایی آنتروتوکسین G با روش الایزا ساندویچ کار نموده‌اند، آزمایش‌ها صورت گرفته به‌طورمعمول بر روی آنتروتوکسین های کلاسیک A-E صورت گرفت، در این تحقیق بر روی آنتروتوکسین غیر کلاسیک G مطالعاتی صورت گرفته که متعلق به خوشه SEC بوده است؛ کارایی الایزا با تجزیه و تحلیل PCR مقایسه شد که آن شامل تمام سویه‌هایی که حاوی SEG بودند برای تولید سموم مثبت بود، حد تشخیص حساسیت با الایزا ساندویچ در حدود ۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر بوده است، برخلاف تحقیق مذکور که روی آنتروتوکسین های غیر کلاسک کار نموده است، این تحقیق روی توکسین های کلاسیک بوده است، ولی مطالعات بیشتری جهت طراحی کیت الایزا دات برای SEG مورد نیاز است، به علت وابستگی کامل این روش به قوه بصر و عدم استفاده از دستگاه‌های آزمایشگاهی طراحی کیت الایزا دات مورد نیاز است(11).

Wu و همکاران در سال ۲۰۱٦ به‌صورت مقایسه ایی به بررسی متدها برای تشخیص توکسین های *استافیلوکوکوس اورئوس* و پیدا کردن روشی پایه برای الایزا که سریع‌ترین جواب دهی و دقیق‌ترین روش باشد پرداختند، تنها چند میکروگرم از توکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* برای ایجاد مسمومیت غذایی در جامعه کافی است در راستای تحقیق مذکور کیت الایزا دات می‌تواند کمک زیادی به تشخیص سریع توکسین های *استافیلوکوکوس اورئوس* داشته باشد(12).

Nia و همکاران در سال ۲۰۱٦ روش‌های شناسایی باکتری‌های را مقایسه کردند، برای شناسایی توکسین B *استافیلوکوکوس اورئوس* در بافر شیر استفاده کردند و نویسندگان گزارش دادند که الایزا غلظت آنتروتوکسین را در مدل‌ها و نمونه‌های غذا دقیق‌تر از سایر مدل‌ها تعیین می‌کند، در راستای این تحقیق، استفاده از کیت الایزا دات برای شناسایی توکسین ها بسیار حیاتی بود، بخصوص این قبیل مطالعات برای آنتروتوکسین B که به‌عنوان بیوتروریسم مطرح است بسیار لازم و ضروری بوده(13).

Singh و همکاران در سال ۲۰۱۷ طی مطالعه‌ای تحت عنوان توسعه و تکامل روش دات_بلات برای ارزیابی سریع و تشخیص آنتروتوکسین A *استافیلوکوکوس اورئوس* در غذا که در هند انجام گرفت توانسته اند آنتروتوکسین A را به میزان تقریبی ng/ml ٤٨ در مواد غذایی مختلف تشخیص دهند، در این مطالعه از دو روش Dot_blot



www.SID.ir

Archive of SID



مستقیم و غیرمستقیم استفاده گردید و از کاغذ نیتروسلولز به‌عنوان بستر انتخابی استفاده شده، حساسیت و اختصاصی بودن روش یادشده به‌وسیله‌ی روش PCR مورد آزمون قرارگرفته و نتایج به‌دست‌آمده به ترتیب ۱۰۰ و ۹۹ ٪ گزارش شد؛ نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که روش ارزیابی Dot_blot به‌عنوان روشی سریع و اولیه برای غربالگری و تشخیص SEA در غذا که موجب مسمومیت در فرد می‌شود استفاده شده است، در راستای همین تحقیق الایزا دات طراحی‌شده هم قادر به تشخیص ۵۰ ng/ml توکسین SEA بوده است، اما برخلاف تحقیق مذکور روش الایزا دات دارای یک مرحله کمتر بود به همین جهت روشی مناسب جهت صرفه‌جویی در زمان بوده است(9).

nouri و همکاران در سال ۲۰۱۷ طی مطالعه‌ای با عنوان طراحی کیت الایزای مستقیم برای تشخیص آنتروتوکسین A *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمونه‌های شیر خام، نشان دادند که کیت طراحی‌شده بیشترین صحت را در تشخیص سم دارا بوده است، ضریب اطمینان کیت مذکور ۰/۹۸٪ و در ۶۰ نمونه‌ی شیر خام نمونه‌برداری شده در منطقه ۳ تهران, ۴۵ نمونه فاقد آنتروتوکسین و ۱۵ نمونه حاوی آنتروتوکسین بوده کیت مذکور در ۲۳ ٪ نمونه‌ها آنتروتوکسین A با غلظت ۱۵/۶ را تشخیص داده و هیچ واکنشی بین آنتروتوکسین های دیگر درطی انجام کار وجود نداشته است تحقیق مذکور برخلاف کیت الایزا دات طراحی‌شده، محدوده کمتری از آنتروتوکسین را شناسایی کرده اما برخلاف آن الایزا دات نیازی به دستگاه برای خواندن مقدار جذب نداشت و به روش چشمی صورت پذیرفته است(14).

Ahari و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی تشخیص سالمونلا تایفی از ٤ کیت برای محل‌های تصفیه و پاک‌سازی آب استفاده کردند، به دلیل اینکه دانش کمی برای شناسایی آنتی‌ژن سالمونلا تایفی در نمونه‌های آب وجود داشت خود دلیلی برای طراحی روش الایزا با تغییر نسبت بافر کربنات در کیت گردیده است؛ مطالعه با شش گروه متفاوت از غلظت سالمونلا تایفی به‌صورت $\frac{cell}{ml}$ ۱۰٤ ۱۰۶و ۱۰۸ و یک کنترل منفی و دو کنترل مثبت با رقت‌های مختلف بافر کربنات شامل ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/٤۰۰و ۱/۸۰۰ در مورد استفاده قرارگرفته است؛ OD اندازه‌گیری شده در ٤ کیت شامل، کنترل مثبت اول (۰/۰۰ ± ۳/٤۹)، کنترل مثبت دوم (۰/۰۰ ± ۳/۷۵) و حدوداً ($P \geq$ ۰/۰۵ ) شده، در کنترل مثبت (۰/۰۰ ± ۳/۲۷)، با کیت اول اندازه‌گیری گردیده؛ همچنین از سوی دیگر تغییرات ضریب کیت اول، دوم و سوم برای همه گروه‌ها به‌جز کنترل منفی‌ها اندازه‌گیری شد ، نتیجه‌گیری نهایی نشان داد که بافر کربنات با رقت ۱/۸۰۰ از آن موردنظر توانایی تشخیص بیشتر سالمونلا تایفی در نمونه‌های آب در روش الایزا داشته است برخلاف این تحقیق که نیازمند الایزا ریدر بوده است کیت الایزا دات نیازمند دستگاه نبود و بسیار روش ساده‌تری بوده است(8).

## نتیجه گیری کلی

طبق نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، از طیف‌های مختلفی برای رقت‌های آنتی‌بادی، آنتی‌ژن و آنتی‌بادی کنژوگه برای طراحی کیت الایزا دات در تشخیص آنتروتوکسین A *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شده و درنهایت با کیت الایزا ساندویچ مقایسه گردیده است علت این کار برای تعیین صحت دقت کیت الایزا دات طراحی شده بوده و از جهت دیگر برتری کیت الایزا دات به علت صرفه جویی در وقت است زیرا در مرحله اول کوتینگ در الایزا ساندویچ حدودا به ۲٤ ساعت زمان نیاز می باشد اما در الایزا دات این مرحله به نیم ساعت رسیده و با انجام تحقیقات تکمیلی



www.SID.ir

Archive of SID



میزان حساسیت هر دو به یک اندازه خواهد رسید. بهترین رقت برای آنتی‌بادی اول ۱/۵۰۰ و برای آنتی‌بادی کنژوگه ۱/۲۰۰۰ به‌دست‌آمده، که توانسته کمترین میزان توکسین یعنی ۵۰ نانوگرم را شناسایی کند و همچنین از چندین بلاک کننده استفاده گردید که بووین سرم آلبومین بهترین جواب را داده است. الایزا دات طراحی‌شده برای تشخیص آنتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* و تشخیص آلودگی نان خامه‌ایی در منطقه ۵ شهر تهران دارای حساسیت، ویژگی نسبی و تکرارپذیری بوده، که طی ۱۰ دقیقه تغییر رنگ را نشان داده و از میان نمونه‌های که به‌صورت رندوم گرفته، حدود ٤ نمونه مثبت و ٣٦ نمونه منفی گزارش‌شده، که حدوداً ۱۰٪ نان‌های خامه‌ایی شیرینی فروشی‌های منطقه ۵ را شامل شده بود.

## فهرست منابع


1. Nikniaz Z, Mahdavi R, Jalilzadeh H, Vahedjabari M. Investigation of microbial load of creamy bread offered in Tabriz confecneries. Food science and nutrition. 1389; 8(1).
2. Betley MJ, Harris TO. Staphylococcal enterotoxins: genetic characterization and relationship between structure and emetic activity. Food microbiology. 1994; 11(109-121).
3. Hui YH, Pierson MD, Graham JR. Food born disease hand book 2th edition. 2001; (107-137).
4. Ahmady M, Kazemi S. Detection of the enterotoxigenic genes (sei,sej) in Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis milk in the West Azerbaijan of Iran. Comp Clin Path. 2013;22(4):649–54.
5. Cook E, Wang X, Robiou N, Fries BC. Measurement of Staphylococcal Enterotoxin B in Serum and Culture Supernatant with a Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay □. 2007;14(9):1094–101.
6. Hassani S, Doust RH, Mobarez AM. Enterotoxin A Gene Barrier Staphylococcus aureus Within Traditionally Dairy Products of Tehran. 2014;2(4).
7. Tasci F, Sahindokuyucu F, Ozturk D. Detection of Staphylococcus species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province. African J Agric Res. 2011;6(4):937–42.
8. Anvar HASKSAA. Detection of Salmonella typhi using four developed kits of ELISA for cleaning in place purification. Int J Environ Sci Technol. 2017;
9. Singh M, Agrawal RK, Singh BR, Mendiratta SK, Agarwal RK, Singh MK, et al. Development and Evaluation of Simple Dot–Blot Assays for Rapid Detection of Staphylococcal Enterotoxin-A in Food. Indian J Microbiol. 2017;57(4):507–11.
10. Kuang H, Wang W, Xu L, Ma W, Liu L, Wang L, et al. Monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin A. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 2013;10(4):1598–608. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
11. Nagaraj S, Ramlal S, Kingston J, Batra HV. Development of IgY based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin G (SEG), an egc toxin. Int J Food Microbiol [Internet]. 2016;237:136–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.009
12. Wu S, Duan N, Gu H, Hao L, Ye H, Gong W, et al. A review of the methods for detection of Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins (Basel). 2016;8(7).




www.SID.ir

Archive of SID



13. Nia Y, Rodriguez M, Zeleny R, Herbin S, Auvray F, Fiebig U, et al. Organization and ELISA-based results of the first proficiency
testing to evaluate the ability of european union laboratories to detect staphylococcal enterotoxin type B (SEB) in buffer and milk. Toxins (Basel). 2016;8(9).
14. Nouri A, Ahari H, Shahbazzadeh D. Designing a Direct ELISA Kit for the Detection of Staphylococcus Aureus Enterotoxin A in Raw Milk Samples from Tehran Province. Int J Biol Macromol [Internet]. 2017; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.052



www.SID.ir