

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

سارا السادات بطحایی<sup>۱</sup>، حامد اهری<sup>۲</sup>، سیدامیرعلی انوار<sup>۳\*</sup>

## 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 نیتروسولوزی با منافذ ۰/۲۲ میکرون به عنوان بستر استفاده شده است، بر روی بستر یاد شده آنتی‌بادی اختصاصی آنتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس با رقت ۱/۵۰۰ 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، سوپسترا اضافه شد؛ در این آزمایش نمونه‌ها به صورت دستی آلوده شده و سپس با روش ساندویچ الیزا 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 به صورت منفی گزارش کرده، در این آزمایش از ۴۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۴ نمونه مثبت گزارش شده، نشان می‌دهد که حدود ۱۰٪ نمونه‌های جمع‌آوری شده آلوده بوده است؛ امروزه با استفاده از کیت الیزا دات به عنوان روش سریع با حساسیت و ویژگی نسبی، می‌توان تکرارپذیری جهت تشخیص آنتروتوکسین A استافیلوکوکوس در نان‌های خامه‌ای را بهبود بخشید.

واژگان کلیدی کیت دات الیزا، 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 به عنوان بیماری‌های ناشی از مواد آلوده‌کننده یا سمی که با مصرف غذا و آب ایجاد می‌گردد، اعلام شده 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 ترشح شده 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 (Staphylococcal food poisoning) SFP یعنی مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی گفته می‌شود که تولید آنتروتوکسین آن در غذاها بخصوص فرآورده‌های گوشتی و لبنی بیشتر است؛ آنتروتوکسین های استافیلوکوکوس از پروتئین‌های تک زنجیره‌ای با میانگیر وزن مولکولی بین ۲۷ تا ۳۴ (KDa کیلودالتون) است (۴).

آنتروتوکسین های استافیلوکوکی جز خانواده توکسین های بیماری‌زا به حساب 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 توکسین‌ها، با این حال نیاز به بررسی بیشتر در زمینه 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)

### 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 پذیرد، 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 تست شده 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 کونزوگه

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

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

### مواد و روش کار

در مجموع ۴۰ نمونه شیرینی خامه‌ایی جمع‌آوری شده از قنادی‌های منطقه ۵ شهر تهران به‌صورت تصادفی در شرایط و زمان مناسب به آزمایشگاه منتقل گردیده و از کاغذ نیتروسولوزی (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 کنزوگه 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 coating 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.

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 (۶،۷). کاغذهای نیتروسولوز به ابعاد ۱ سانتی‌متر مربع برش خورده و در پلیت ۲۴ 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 ۳٪ BSA که با PBS رقیق شده بوده اضافه گردیده و بعد از گذشت ۱ ساعت چاهک‌ها یکبار با PBS شسته شده (۹). به چاهک‌های کنترل مثبت آنتروتوکسین با غلظت ۵۰ 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 خامه‌ای 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 نمونه‌ها را داخل سانتریفیوژ قرار داده تا چربی خامه، روی سطح قرار گرفته، 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 رقیق شده 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 قرار گرفته 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).

اضافه گردید و لازم به ذکر است که برای رسیدن به بهترین رقت به تعداد دفعات رقت‌های مختلف تست شده، 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 کنژوگه 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 کنژوگه ای که به آنتی‌ژن متصل نشده بودند جدا و در نهایت شسته شدند، از فاکتورهای تأثیرگذار بر طراحی الایزا دات دمای آزمایشگاه بوده، بطوریکه هر چه دما پایین‌تر باشد زمان انکوباسیون‌ها افزایش یافته، 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-phenyldiamine) را استفاده نموده، در این مرحله آنتی‌بادی کنژوگه، 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

جدول ۱- میزان جذب آنتی‌بادی کنژوگه در طول موج ۴۵۰ نانومتر

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

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

نتایج حاصل از کیت الایزا دات	جذب در ۴۵۰ نانومتر الایزا	توکسین
آبی	$0.1873 \pm 0.093$	۱۰۰
آبی	$0.564 \pm 0.33$	۵۰
بی‌رنگ	$0.429 \pm 0.165$	۲۵
بی‌رنگ	$0.326 \pm 0.152$	۱۲/۵
بی‌رنگ	$0.348 \pm 0.115$	۰

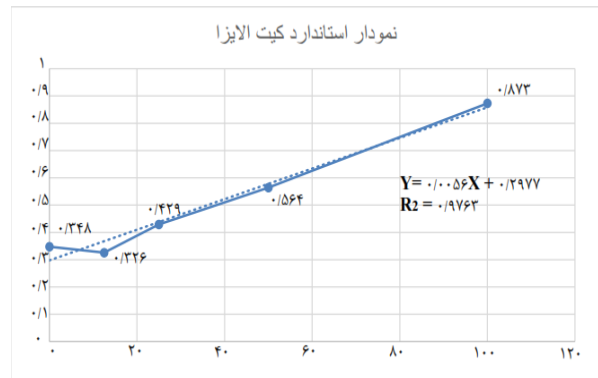
دقیقه تغییر رنگ کاغذها به‌خوبی نمایان گردید و کنترل مثبت‌ها، آبی‌رنگ و کنترل منفی‌ها، سفید رنگ باقی‌مانده، برای

بعد از خشک شدن کامل، TMB به میزان ۲۰ میکرولیتر بر روی تمام کاغذها ریخته شده است. بعد از گذشت مدت زمان ۱۰

با بررسی نتایج آمار توصیفی به دست آمده نشان داده شده که کیت دارای دو رنگ آبی و سفید است، غلظت های استاندارد خوانده شده با الایزا ساندویچ برای کیت سفید دارای کمینه ۰ نانوگرم، بیشینه ۵۰ نانوگرم و برای کیت آبی دارای کمینه ۵۰ نانوگرم، بیشینه ۱۰۰ نانوگرم بوده است. نتایج به دست آمده از الایزا ساندویچ با جدول و نمودار استاندارد کیت دات الایزا (جدول ۲) مطابقت داده شد و مشاهده گردید بیشترین میزان میانگین غلظت سم آنتروتوکسین در نمونه نان خامه ای که باعث تغییر رنگ کیت دات الایزا گردیده، در گروه غلظت استاندارد ۱۰۰ ng/ml قرار داشته و با مقایسه با نمونه ها توسط الایزا ساندویچ دارای این میانگین ( $SD=۳/۲۸$ ) ( $AVG=۹۰/۱۱$ ) بوده، به همین ترتیب کمترین میزان میانگین غلظت سم آنتروتوکسین در نمونه نان خامه ای که باعث تغییر رنگ کیت دات الایزا نگردیده است، در گروه غلظت استاندارد ۰ ng/ml قرار داشته و با مقایسه با نمونه ها توسط الایزا ساندویچ دارای این میانگین ( $SD=۰/۷۳$ )، ( $Avg.=۵/۲۸$ ) بوده است.

به منظور تحلیل بیشتر و به دست آوردن نتیجه آماری قابل استناد مبنی بر مؤثر بودن کیت طراحی شده دات الایزا در تشخیص سم آنتروتوکسین در غلظت های مختلف، اقدام به انجام آزمون آنالیز واریانس یک متغیره، با استفاده از داده های خام موجود گردید (جدول ۴). نتایج تحلیل آماری به عمل آمده نشان می دهد، به لحاظ آماری، کیت طراحی شده دات الایزا توان تشخیص سم آنتروتوکسین موجود در نمونه های نان خامه ای در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر را دارد ( $F=۶۰/۸۴۰$ )، ( $\alpha=۰/۰۰$ ). همچنین با بررسی بیشتر جداول (۴) و (۵) مشاهده گردیده است، نمودار استاندارد طراحی شده کیت دات الایزا نمودار (۱) و

نمونه های مورد آزمایش، از ۴۰ نمونه ۴ نمونه آبی رنگ شد که نتایج حاصله با الایزا ساندویچ مقایسه گردید که در ادامه به طور مفصل به آن پرداخته شده است (۸،۹). طبق دستور عمل در بروشور شرکت سیگما آنتی بادی اول خریداری شد؛ که میزان مناسب برای روش الایزا و وسترن بلات ۱/۲۰۰۰ ذکر شده است؛ به همین منظور از همین غلظت برای کیت آنتی بادی اول در روش الایزا استفاده شد اما میزان مناسب مورد استفاده در روش دات الایزا ۱/۵۰۰ بوده؛ میزان جذب توکسین حاصل از ۳ تکرار، ثبت گردیده است. سپس نمودار کیت الایزا طراحی شده در شکل نشان داده شده، براساس معادله ی به دست آمده از منحنی  $R^2$  برابر ۰/۹۰۲۵ شده است:



نمودار ۱: نمودار استاندارد کیت الایزا

$$Y = 0.0056X + 0.2977$$

$$R^2 = 0.9763$$

$y$  در معادله فوق برابر با میزان جذب آنتروتوکسین  $A$  در طول موج ۴۵۰ نانومتر در نمونه ی استاندارد و  $x$  غلظت آنتروتوکسین بوده، کیت دات الایزا طراحی شده 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 ۲ بوده است.

جدول ۴- جدول آنالیز واریانس

متغیر وابسته: غلظت بر حسب ng/ml

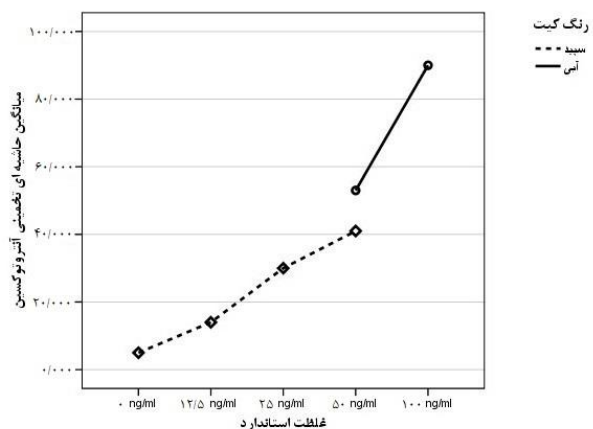
Sig.	F	درجه آزادی	مبدأ آماری
/۰۰۰	۶۰/۸۴۰	۱	رنگ کیت دات الایزا
/۰۰۰	۶۸۹/۴۱۵	۴	غلظت استاندارد

جدول ۵- غلظت استاندارد آنروتوکسین

میانگین گروه استاندارد غلظت					غلظت استاندارد	آزمون	
۵	۴	۳	۲	۱	تعداد	آنروتوکسین	
				۵/۲۷۹۰۹	۲۲	ng/ml۰	Tukey
			۱۴/۳۷۸۹۷		۳	ng/ml۱۲/۵	HSD <sup>a</sup>
		۳۰/۲۱۲۳۰			۶	ng/ml۲۵	
	۴۵/۱۷۲۶۲				۷	ng/ml۵۰	
۹۰/۱۱۳۱۰					۲	ng/ml۱۰۰	

### بحث

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



نمودار ۲- میانگین حاشیه ای تخمینی غلظت آنروتوکسین

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 ۲۰۱۶ به صورت 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 می تواند کمک زیادی به تشخیص سریع توکسین های استافیلوکوکوس اورئوس داشته باشد (12).

Nia و همکاران در سال ۲۰۱۶ روش های شناسایی باکتری های را مقایسه کردند، برای شناسایی توکسین B استافیلوکوکوس اورئوس در بافر شیر استفاده کردند و نویسندگان گزارش دادند که الایزا غلظت آنروتوکسین را در مدل ها و نمونه های غذا دقیق تر از سایر مدل ها تعیین می کند، در راستای این تحقیق، استفاده از کیت الایزا دات برای شناسایی توکسین ها بسیار حیاتی بود، بخصوص این قبیل مطالعات برای آنروتوکسین B که به عنوان بیوتورویسم مطرح است بسیار لازم و ضروری بوده (13).

Singh و همکاران در سال ۲۰۱۷ طی مطالعه ای تحت عنوان توسعه و تکامل روش دات\_بلات برای ارزیابی سریع و تشخیص آنروتوکسین A استافیلوکوکوس اورئوس در غذا که در هند انجام گرفت توانسته اند آنروتوکسین A را به میزان تقریبی ۴۸ ng/ml در مواد غذایی مختلف تشخیص دهند، در این مطالعه از دو روش Dot\_blot

شد و مقداری که یافت شد به ترتیب حدود ۰/۰۶ و ۰/۰۲۸۲ تا ۲ ng/ml بود، واکنش پذیری در اینجا با آنروتوکسین B، C، D و E بسیار ناچیز بود، آن ها به این نتیجه رسیده اند که روش ساندویچ الایزا برای شناسایی آنروتوکسین A بسیار مؤثر بوده است در راستای تحقیق مذکور نشان داده که انتخاب روش الایزا ساندویچ به عنوان گلد استاندارد بسیار مناسب است (10).

Hassani و همکاران در سال ۲۰۱۴ به مسدود کردن ژن آنروتوکسین A در استافیلوکوکوس اورئوس موجود در محصولات لبنی سستی در تهران اقدام کرده اند، هدف از این مطالعه جداسازی آنروتوکسین 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 آنروتوکسین ها نبوده و برخلاف تحقیقات مذکور روش الایزا دات روش بسیار سریع تری بوده بنابراین از نظر زمانی و هزینه بسیار مقرون به صرفه است (6).

Nagaraj و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی شناسایی آنروتوکسین G با روش الایزا ساندویچ کار نموده اند، آزمایش ها صورت گرفته به طور معمول بر روی آنروتوکسین های کلاسیک A-E صورت گرفت، در این تحقیق بر روی آنروتوکسین 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 سویه هایی که حاوی SEG بودند برای تولید سموم مثبت بود، حد تشخیص حساسیت با الایزا ساندویچ در حدود ۱ نانوگرم بر میلی لیتر بوده است، برخلاف تحقیق مذکور که روی آنروتوکسین های غیر کلاسیک کار نموده است، این تحقیق روی توکسین های کلاسیک بوده است، ولی مطالعات

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 به صورت  $\frac{cell}{ml}$   $10^6$  و  $10^8$  و یک کنترل منفی و دو کنترل مثبت با رقت‌های مختلف بافر کربنات شامل  $1/100$ ،  $1/200$ ،  $1/400$  و  $1/800$  در مورد استفاده قرار گرفته است؛ OD اندازه‌گیری شده در ۴ کیت شامل، کنترل مثبت اول ( $0/00 \pm 3/49$ )، کنترل مثبت دوم ( $0/00 \pm 3/75$ ) و حدوداً ( $P \geq 0/05$ ) شده، در کنترل مثبت ( $0/00 \pm 3/27$ )، با کیت اول اندازه‌گیری گردیده؛ همچنین از سوی دیگر تغییرات ضریب کیت اول، دوم و سوم برای همه گروه‌ها به جز کنترل منفی‌ها اندازه‌گیری شد، نتیجه‌گیری نهایی نشان داد که بافر کربنات با رقت  $1/800$  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 در نهایت 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 حدوداً به ۲۴ ساعت زمان نیاز می‌باشد اما در الایزا دات این مرحله به نیم ساعت رسیده و با انجام تحقیقات تکمیلی

مستقیم و غیرمستقیم استفاده گردید و از کاغذ نیتروسولونز به‌عنوان بستر انتخابی استفاده شده، حساسیت و اختصاصی بودن روش یادشده به‌وسیله‌ی روش PCR مورد آزمون قرار گرفته 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 طراحی شده هم قادر به تشخیص  $50 \text{ ng/ml}$  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 الایزا مستقیم برای تشخیص آنتروتوکسین A /استافیلوکوکوس اورئوس در نمونه‌های شیر خام، نشان دادند که کیت طراحی شده بیشترین صحت را در تشخیص سم دارا بوده است، ضریب اطمینان کیت مذکور  $98/0\%$  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  $23\%$  نمونه‌ها آنتروتوکسین A با غلظت  $15/6$  را تشخیص داده و هیچ واکنشی بین آنتروتوکسین‌های دیگر در طی انجام کار وجود نداشته است تحقیق مذکور برخلاف کیت الایزا دات طراحی شده، 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 ۴ کیت برای محل‌های تصفیه و پاک‌سازی



- 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).

میزان حساسیت هر دو به یک اندازه خواهد رسید. بهترین رقت برای آنتی‌بادی اول ۱/۵۰۰ و برای آنتی‌بادی کنژوگه ۱/۲۰۰۰ به دست آمده، که توانسته کمترین میزان توکسین یعنی ۵۰ نانوگرم را شناسایی کند و همچنین از چندین بلاک کننده استفاده گردید که بویین سرم آلبومین بهترین جواب را داده است. الایزا دات طراحی شده 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 به صورت رندوم گرفته، حدود ۴ نمونه مثبت و ۳۶ نمونه منفی گزارش شده، 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

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>