

چکیده

مقدمه: گسترش روزافزون کاربردهای پزشکی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم، ضرورت دستیابی به روش‌های تولید و حفظ فعالیت بیولوژیک آن را اجتناب‌ناپذیر کرده است. لذا هدف این تحقیق، تولید و ابقای فعالیت توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم می‌باشد.

روش کار: در این تحقیق، کشت ۲۴ ساعته کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A را به محیط کشت غنی شده تریپتی‌کیز سوی برات تلقیح و در خلال گرم‌خانه‌گذاری تولید توکسین بررسی و تعیین شد. با افزودن اسید سولفوریک به کشت ۹۶ ساعته آن را اسیدی نموده و با سانتریفوژ رسوب حاصل جمع‌آوری گردید. سپس توکسین موجود در آن به صورت کریستالیزه در آورده شد. در جریان عمل، وجود توکسین با استفاده از تزریق به موش سوری تأیید گردید.

یافته‌ها: کلستریدیوم بوتولینوم در شرایط ذکر شده، در این آزمایش رشد نموده و توکسین تولید نمود، به طوری که ۹۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری حداکثر مقدار توکسین تولید گردید. توکسین تولید شده در محدوده pH ۴ الی ۵/۸ به صورت کریستال‌های مکعب مستطیلی شکل تبدیل شد. پایداری توکسین کریستالیزه شده در طول زمان بررسی و تعیین گردید و مشخص شد که نگهداری توکسین کریستالیزه شده در یخچال ۴ تا ۶ درجه سانتی‌گراد، پس از ۴ سال فعالیت بیولوژیک خود را حفظ کرده است.

نتیجه‌گیری: توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم در محیط آزمایشگاه به سرعت غیرفعال می‌گردد. بنابراین، حفظ فعالیت بیولوژیک آن برای مدت طولانی از اهمیت زیادی برخوردار است. چنانچه نتایج این تحقیق نشان داد، فعالیت بیولوژیک این توکسین در حالت کریستالیزه برای مدت طولانی پایدار باقی می‌ماند. بنابراین، استفاده از این امر هم برای پیشگیری از بوتولیسم و هم کاربردهای تحقیقاتی امکان‌پذیر می‌گردد.

کل‌واژگان: کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A، توکسین، کریستالیزاسیون، فعالیت بیولوژیک.

مقدمه

همچنین، تهیه آنتی‌بادی‌های پلی و منوکلونال به منظور درمان بوتولیسم و نیز تحقیق جهت تهیه و تولید واکسن کاراً از اولویت‌های مهم پزشکی درآمده است (۹-۷). شناسایی مکانیسم‌های مختلف بیولوژیک، کاربرد این سم را در پزشکی و نیز در تحقیقات اجتناب‌ناپذیر کرده است (۱۰ و ۱۱). به علاوه، کنترل مواد غذایی و جلوگیری از بیماری مهلک بوتولیسم بسیار حایز اهمیت است (۱۲ و ۱۳). همچنین، دستیابی به روش‌های تشخیص سریع سم بوتولیسم با استفاده از فعالیت کاتالیتیک آن بر سوسترای اختصاصی از روش‌های معتبر ذکر شده است (۱۴). در تمام این موارد، تولید سم، حذف مواد زائد و ناخالصی‌های همراه آن، به طوری که خللی در فعالیت بیولوژیک آن وارد نشود، از نکات بسیار ضروری است. به عبارت دیگر جلوگیری از کاهش فعالیت، بیولوژیک توکسین بوتولینوم بسیار حائز اهمیت است.

بیش از یک قرن از شناسایی عامل بیماری مهلک بوتولیسم گذشته (۱) و نشان داده شده است که عامل بیماری یک توکسین پروتئینی است که به دلیل تأثیر بر محل اتصال عصب عضله و ایجاد فلج شل، نوروتوکسین نام گرفته است. در واقع این توکسین یکی از قوی‌ترین سموم شناخته شده می‌باشد (۲). با آن که از بدو شناسایی بوتولیسم تاکنون تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌های باکتری‌شناسی، سم‌شناسی، درمان و پیش‌گیری از این بیماری انجام شده است؛ با وجود این، از جنبه‌های مختلف بهداشتی، درمانی و بیولوژی (۳) هنوز هم برای بسط و گسترش تحقیق پیرامون توکسین تیپ A بوتولینوم دلایل متعددی ذکر شده است که اهم آنها عبارتند از: استفاده از این توکسین در درمان تعداد زیادی از بیماری‌های اسپاسمودیک که به‌عنوان یک داروی فراگیر با نتایج درخشان همراه بوده است (۴-۶).

میکرومتری استریل شد. سپس با استفاده از روش براد فورد^۵ غلظت کل پروتئین (پروتئین توتال) اندازه گیری شد (۱۶). برای تعیین نورو توکسیسیته هر یک از کشت‌ها، پس از ۹۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، ۰/۳ تا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره استریل شده کشت، به صورت داخل صفاقی در موش‌های ۲۲-۱۸ گرمی تزریق گردید و حداکثر تا ۴۸ ساعت حیوان تحت مراقبت بود. به علت محدود بودن تعداد موش از هر نمونه تنها به ۳ موش تزریق می‌شد. این آزمون همیشه با کنترل (۰/۶ میلی‌لیتر حاوی ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استریل شده و ۰/۳ میلی‌لیتر آنتی‌توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم) همراه بود (۱۷) و (۱۸).

برای جداسازی توکسین، کشت ۹۶ ساعته را با ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. مایع رویی را جدا نموده، ابتدا از فیلتر ۲۰ کیلودالتون عبور داده و محلول تغلیظ شده باقی‌مانده از فیلتر ۱۰۰ کیلودالتون عبور داده شد. هر یک از محلول‌های روی فیلتر ۱۰۰ کیلودالتون، محلول عبور کرده از فیلتر ۱۰۰ کیلودالتون و محلول روی فیلتر ۲۰ کیلودالتون از نظر غلظت نورو توکسیسیته مورد بررسی قرار گرفت.

کریستالیزاسیون توکسین تولید شده بر اساس روش سوچی یاما^۶ با مختصر تغییراتی در آن طی مراحل زیر انجام شد (۱۹) و (۲۰).

۱- کشت ۴ روزه کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A را با اسید سولفوریک اسیدی کرده (pH=۳/۴) و با قرار دادن آن در دمای آزمایشگاه، پس از یک شب محتویات کشت به صورت رسوب درآمد.

۲- مایع رویی شفاف شده را خارج کرده، رسوب جمع‌آوری و با آب مقطر استریل شستشو داده شد (نحوه شستشو با سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد).

۳- رسوب حاصل را جدا نموده و در آب مقطر با pH = ۶/۸ حل شد سپس کلراید کلیسم به آن اضافه گردید تا غلظت ۰/۰۷۵ مولار حاصل شود.

۴- pH محلول مرحله ۳ را به ۳/۷ رسانده تا رسوب سمی شیرینی رنگ تشکیل شود.

۵- رسوب حاصل با سانتریفوژ جدا (۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و در بافر فسفات ۰/۰۳ مولار با pH = ۶/۸ حل گردید.

یکی از روش‌های حفظ فعالیت بیولوژیک این سم نگهداری آن در حالت کریستالیزه است. از این رو، هدف این تحقیق تولید و کریستالیزاسیون سم A بوتولینوم در شرایط آزمایشگاه است.

روش کار

در این تحقیق موش سفید آزمایشگاهی به وزن ۱۸ تا ۲۲ گرم از انستیتو پاستور ایران، کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A و پادتن اختصاصی توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم از Tarasoich Musco، محیط کشت تریپتیکیز سوی برات^۱ سیستمین هیدروکلراید، عصاره مخمر^۲، گلوکز منویدرات، هیدروکسید سدیم، کلراید کلسیم، جار و گاز پک از مرک، آمونیوم سولفات، اسید کلریدریک، اتانل، اسید تری کلرو استیک اسید، پلی‌اکریل آمید، بیس‌اکریل‌آمید، آمونیوم پرسولفات، تمد و آگاروز از سیگما و فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرومتری، فیلتر ۲۰ و ۱۰۰ کیلودالتون از سارنوریوس تهیه گردید.

به منظور کشت توکسین ۲ لیتر محیط تولید توکسین تهیه و استریل گردید (۱۲۱) درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند، به مدت ۱۵ دقیقه). سپس به نسبت ۲ تا ۳ درصد با کشت ۲۴ ساعته^۳ (حاوی $10^8 \times 6/3$ سلول در میلی‌لیتر) تلقیح و در شرایط استریل (زیر هود بیولوژیک) در شیشه‌های مخصوص کشت خون توزیع گردید (۷۰ میلی‌لیتر در هر شیشه) و در شرایط بی‌هوای (استفاده از جار و گاز پک) گرم‌خانه‌گذاری شدند و در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۰۸ و ۱۲۰ ساعت، هر یک را از شرایط بی‌هوای خارج و ۱۰ میلی‌لیتر آن را برداشته و جهت اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر، اندازه‌گیری مقدار پروتئین^۴ و تعیین نورو توکسیسیته به کار رفت (۱۵).

از هر یک از شیشه‌های کشت که به مدت مشخصی گرم‌خانه‌گذاری شده بودند، کدورت‌سنجی انجام شد. بدین ترتیب که ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت را در لوله مخصوص (کوت) اسپکتروفوتومتر ریخته و ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و در طول موج ۵۴۵ نانومتر میزان جذب آن تعیین گردید (۱۵).

از هر یک از شیشه‌ها که در زمان تعیین شده گرم‌خانه‌گذاری شده بودند، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و سانتریفوژ گردید (۵۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و با فیلتر ۰/۴۵

¹ Trypticase soy broth

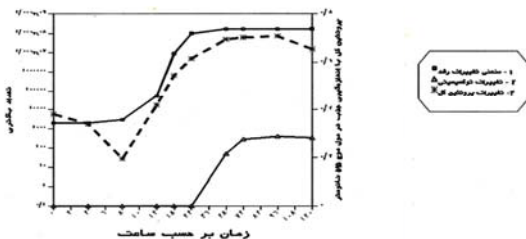
² Yeast extract

³ Pre-culture

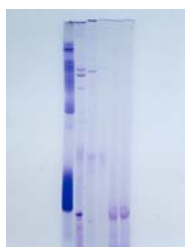
⁴ Total protein

⁵ Braod ford

⁶ Sugiyama



نمودار ۱- منحنی رشد و تغییرات غلظت پروتئین و نیز نورو توکسیسیته عصاره کشت کلسترییدیوم بوتولینوم تیپ A پس از ۱۲۰ ساعت گرم خانه گذاری



شکل ۲- SDS- پلی آکرلامید ژل الکتروفورز استاندارد سرم آلبومین و مراحل مختلف استخراج توکسین

در این تحقیق وجود توکسین تیپ A کلسترییدیوم بوتولینوم با استفاده از آزمون، تزریق به موش آزمایشگاهی و مشاهده اثرات نورو توکسیسیته و خنثی کردن این اثرات با آنتی توکسین اختصاصی انجام شد.

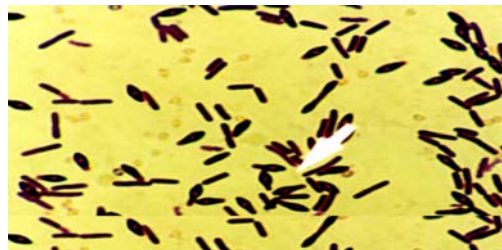
تزریق داخل صفاقی ۰/۵ میلی لیتر رقت های مختلف عصاره کشت ۹۶ ساعته، باعث ایجاد علایمی از قبیل: افزایش فعالیت عضلات شکمی دخیل در تنفس، انقباض عضلات شکم، بهت زدگی، شل شدن اندام انتهایی، فلج کامل و مرگ حیوان شد. بسته به رقت عصاره سمی، شروع علایم ۱ تا ۶ ساعت پس از تزریق ایجاد شد. همچنین، مرگ حیوان نیز ۱۲ تا ۳۰ ساعت بعد روی داد. رقت 10^{-2} عصاره کشت با هم حجم آنتی توکسین اختصاصی به طور کامل از ایجاد علایم در موش جلوگیری کرد.

الکتروفورز مراحل مختلف استخراج توکسین تیپ A کلسترییدیوم بوتولینوم در شکل ۲ نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می شود خط ۱، استاندارد سرم آلبومین؛ خط ۲، عصاره کشت تغلیظ شده با فیلتر ۱۰ KDa؛ خط ۳، عصاره تغلیظ شده با فیلتر ۲۰ KDa؛ خط ۴، عصاره تغلیظ شده کشت ۹۶ ساعته کلسترییدیوم بوتولینوم تیپ A با فیلتر ۱۰۰ KDa؛ خطوط ۵ و ۶ پس آب فیلتر ۱۰۰ KDa و توکسین استخراج شده از محیط کشت ۹۶ ساعته را نشان می دهد. چنانچه مشاهده می شود،

۶- با اضافه کردن سولفات آمونیوم به نسبت ۳۷/۲ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر و نگهداری آن در دمای ۵- درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۷ روز بلور های کریستالی توکسین تشکیل شد. این عمل با محلول استخراج شده از طریق اولترافیلتراسیون نیز تکرار گردید. در این تحقیق. میزان همبستگی بین تولید پروتئین کل و رشد باکتری با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید.

نتایج

باکتری لیوفیلیزه در محیط تریپتیکیز سوی برات حاوی افزودنی ها، پس از ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط بی هوازی باعث کدورت محیط شد. انتقال (پاساژ) از کشت ۴۸ ساعته به محیط تریپتیکیز سوی حاوی ۵ درصد آگار و گرم خانه گذاری آن به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی هوازی، پرگنه های یکنواخت رشد کرد. رنگ آمیزی گرم از آنها باسیل های گرم مثبت مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱- رنگ آمیزی گرم از کشت ۴۸ ساعته کلسترییدیوم بوتولینوم تیپ A در محیط تریپتیکیز سوی حاوی ۵ درصد آگار؛ باسیلها با اسپور نیمه انتهایی نشان داده شده است.

رشد باکتری با روش های زیر تأیید گردید:

۱- پس از ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری پرگنه های مشخص و قابل شمارش در سطح محیط کشت ایجاد گردید.

۲- با اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر، روند تغییرات رشد در طی گرم خانه گذاری تعیین شد.

۳- اندازه گیری تغییرات پروتئین محیط کشت در طی گرم خانه گذاری، روند رشد باکتری را نشان داد (نمودار ۱).

تولید توکسین نیز با روش های زیر تأیید شد:

۱- در آزمون ژل دیفیوژن، خط رسوبی ناشی از واکنش توکسین و آنتی توکسین ایجاد گردید.

۲- تزریق عصاره استریل شده کشت ها به صورت داخل صفاقی و مشاهده اثر فلج کنندگی نورو توکسین و مهار این اثرات با آنتی سرم اختصاصی، وجود توکسین را تأیید کرد.

۳- الکتروفورز و مشاهده باند ۱۵۰ کیلو دالتون (شکل ۲).

مرحله سکون است. با ادامه مرحله سکون، تولید توکسین افزایش می‌یابد. در واقع قبل از این که باکتری وارد مرحله اسپور گذاری شود، تولید توکسین وجود دارد و شروع اسپور گذاری با کاهش غلظت توکسین همراه است. در واقع تولید و ترشح توکسین در انتهای رشد لگاریتمی و ابتدای مرحله سکون رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد در این موارد باکتری دچار فقر غذایی شده و راهی جز تبدیل شدن به اسپور را نداشته باشد. از این رو، شروع به سنتز پروتئین‌های لازم برای اسپور سازی می‌کند. یکی از این پروتئین‌ها که نورو توکسین می‌باشد، احتمالاً یک پپتیداز ضروری برای ساخت واحدهای سازنده لایه‌های نفوذناپذیر اسپور باشد. زیرا مولکول‌هایی از توکسین در دیواره اسپور نشان داده شده است (۲۳).

یکی از نکات بسیار مهم در مورد توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم، پایداری آن است. از آنجا که دوز کشنده آن بسیار کم است و ۱ - ۰/۱ میکروگرم برای نابودی یک انسان کافی است لذا شرایطی که در آن فعالیت توکسین حفظ گردد، بسیار حائز اهمیت است. انتظار می‌رود، شیوع بوتولیسم زیاد باشد؛ اما با وجود آن که ۴ نوع بوتولیسم وجود دارد. به نظر نمی‌رسد سالانه بیش از ۳۰۰۰ مورد از این بیماری وجود داشته باشد (۲۴).

بدون شک یکی از علل کاهش شیوع بوتولیسم، پیشرفت‌های بهداشتی در جهان است. با وجود وفور باکتری‌های عامل بوتولیسم در محیط، آمار سالیانه این بیماری چندان قابل توجه نیست. لذا، آسیب‌پذیری توکسین در محیط از اهمیت زیادی برخوردار شده است. گزارش‌های متعددی در خصوص آسیب‌پذیری توکسین وجود دارد. با آن که تاکنون، نیمه عمر توکسین بوتولینوم گزارش نشده اما عقیده بر این است که پروتئین‌های همراه سم به عنوان محافظت کننده سم از عوامل محیطی از جمله: اکسیداسیون، آنزیم‌های هیدرولیز کننده و مواد احیاء کننده را می‌توان نام برد (۲۵). در هر حال، توکسین به صورت کمپلکس (نورو توکسین همراه مولکول غیرسمی و نیز مولکول هماگلوٹینین) پایدارتر از توکسین خالص است. افزون بر آن سمیت دهانی توکسین کمپلکس بیش از توکسین خالص است. زیرا توکسین خالص تحت تأثیر شیره معده از بین می‌رود. با آن که خاصیت ایمنی‌زایی آن باقی است، فاقد اثرات سمی می‌باشد (۲۶). به علاوه توکسین کمپلکس در شرایط اسیدی (۵ - ۳/۵ pH) مدت‌ها پایدار است (۲۷).

از این رو، دست‌یابی به روش‌هایی که بتواند ساختار کمپلکس توکسین را حفظ کرده و باعث پایداری آن گردد، بسیار حایز اهمیت است. لذا، روش کریستالیزاسیون ابداع شده است. توکسین کریستالیزه شده نیز برای سال‌ها در شرایط معمولی پاییز ۸۵، دوره نهم، شماره سوم

باند‌های ۱۵۰، ۱۰۰ و ۵۰ کیلوالتون دیده می‌شوند. افزون بر این، باندهای کمتر از ۲۰ کیلوالتون نیز دیده می‌شود. چنانچه در شکل ۳ نشان داده شده است، محلول سمی استخراج شده در این تحقیق، قابلیت کریستاله شدن داشت و به کریستال‌های مکعب مستطیلی شکل با ابعاد مختلف در آمد.



شکل ۳- کریستال‌های محلول سمی استخراج شده از کشت کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A

بحث و نتیجه گیری

یکی از ویژگی‌های توکسین تیپ A کلستریدیوم بوتولینوم، مقاومت آن به شرایط اسیدی است. لذا، از این خاصیت برای جداسازی توکسین استفاده شده است؛ زیرا توکسین بدون آسیب دیدن در pH= ۳/۵ رسوب می‌کند. از این رو، در سال ۱۹۴۶ میلادی کارل لامانا و همکاران اقدام به کریستالیزاسیون^۱ توکسین بوتولینوم نمودند (۲۱).

عوامل متعددی باعث شد، پژوهشگران درصدد تولید و نگهداری توکسین به صورت کریستالیزه برآیند. زیرا توکسین کریستالیزه شده خالص نیست. بلکه به صورت مولکولی کمپلکس است که متشکل از پروتئین‌های غیرسمی، پروتئین با خاصیت هماگلوٹینین و نیز بخش نورو توکسینی است. نورو توکسین در این شرایط بسیار پایدار است و برای مدت‌ها فعالیت بیولوژیک خود را حفظ می‌کند (۲۲).

در این تحقیق، روند رشد تولید پروتئین و نیز تولید توکسین نشان داده شد. بین رشد لگاریتمی و تولید پروتئین کل، همبستگی در جهت مثبت وجود دارد ($r= ۰/۹۳۵$ و $p= ۰/۰۰۲$). در حالی که تولید توکسین در انتهای فاز لگاریتمی شروع و تا نیمه‌های فاز سکون ادامه می‌یابد (نمودار ۱). با آن که پروتئین‌های تولید شده قبل از ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری فاقد اثرات نورو توکسینی هستند. ماهیت آنها برای ما ناشناخته است. با این حال، نقش متابولیسمی آنها در روند رشد، قابل انکار نیست. در این تحقیق، یافته قابل توجه آن است که تولید توکسین بعد از ۱۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری و در انتهای رشد لگاریتمی و ابتدای

^۱ Crystallization

الف- روش بیولوژیک (تزریق داخل صفاقی به موش) و مشاهده علائم فلجی و مرگ حیوان و جلوگیری از این علائم با آنتی توکسین اختصاصی.

ب- استفاده از واکنش رسوب توکسین با آنتی توکسین اختصاصی (ژل دیفیوژن)

ج- الکتروفورز و مشاهده باندها ۱۵۰ کیلو دالتونی.

به این ترتیب توکسین تیپ A کلاستریدیوم بوتولینوم از محیط کشت مایع جداسازی شده و به صورت تقریباً خالص تهیه گردید و پس از آن کریستالیزه شد. تولید کریستال در شرایط آزمایشگاه و دمای اتاق، بعد از ۷ روز حاصل گردید.

در هر حال، نتیجه این تحقیق نشان داد، توکسین کلاستریدیوم بوتولینوم پس از استحصال می تواند در شرایط اسیدی به صورت کریستالیزه در آمده و برای مدت ها پایدار و دارای فعالیت نورو توکسینی باشد که با آنتی سرم اختصاصی تیپ A کلاستریدیوم بوتولینوم غیرفعال گردید.

این امر باعث می شود امکان تولید انبوه و نگهداری طولانی مدت مقدار زیادی توکسین با شرایط یکسان و فعالیت بیولوژیک مشخص فراهم گردد و بنابراین به درمان بیماری هایی که توسط توکسین تیپ A کلاستریدیوم بوتولینوم ایجاد می شود رونق بهتری بخشد.

(۱۰-۴ درجه سانتی گراد) پایدار مانده و برای تخلیص به کار می رود (۲۰). در حالی که سم خالص به سرعت غیرفعال می گردد. علت غیرفعال شدن سم در غلظت نانوگرم معلوم نیست.

به نظر می رسد، اکسیداسیون خود به خود باعث ایجاد تغییرات ساختمانی گردد که نتیجه اش غیرفعال شدن سم و تبدیل آن به توکسوئید است. بنابراین انتخاب شرایط فیزیوشیمیایی مناسب و محافظت کننده ای که بتواند در غلظت بسیار کم مانع غیرفعال شدن سم گردد، افزایش مدت نگهداری توکسین را موجب می شود (۲۸).

در هر حال، غیرفعال شدن سریع نورو توکسین تیپ A بوتولینوم، کاربردهای پزشکی آن را با مشکل مواجه کرده است و در صورتی که مکانیسمی برای پایداری توکسین ایجاد شود. کاربرد آن را در پزشکی تسهیل کرده و مشکلات موجود را کاهش می دهد (۲۹).

در این تحقیق، پس از دستیابی به شرایط مطلوب برای رشد، تولید توکسین از آن تأیید شد. با آن که روش های متعددی برای تشخیص توکسین کلاستریدیوم بوتولینوم وجود دارد؛ در این تحقیق توکسین تیپ A کلاستریدیوم بوتولینوم با استفاده از روش های زیر تشخیص داده شد:

References

- Melling J, Hambleton P, Shone CC. *Clostridium botulinum* toxin: nature and preparation for clinical use. *Eye* 1988; 2: 16- 23.
- Jankovic J, Brin FM. Therapeutic uses of botulinum toxin. *N Eng J Med* 1991; 324(17): 1186- 1194.
- Sand J, Nordback I, Arvola P, et al. Effects of botulinum toxin A on the sphincter of Oddi: an *in vivo* and *in vitro* study. *Gut* 1998; 42: 507- 510.
- Restivo DA, Marchese- Ragona R, Louria G, et al. Botulinum toxin treatment for oropharyngeal dysphagia associated with diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2006; 29(12): 2650- 2653.
- Felber ES. Botulinum toxin in primary care medicine. *J Am Osteopath Assos* 2006; 106 (10): 609- 14.
- Moore C, Rackley R, Goldman H. Urologic applications of botox. *Curr Urol Rep* 2005; 6 (6):419-23.
- Kozaki S, Miki A, Kamata Y, et al. Immunological characterization of apain- induced fragments of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin and interaction of the fragments with brain synapses. *Infect Immun* 1989; 57(9): 2634- 2639.
- Shone C, Wilton- smith P, Appleton N, et al. Monoclonal antibody- based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50(1): 63- 67.
- Chen F, Kuziemko MG, Amersdorfer P, et al. Antibody mapping to domains of botulinum neurotoxin serotype A in the complexed and uncomplexed forms. *Infect Immun* 1997; 65(5): 1626- 1630.
- Nifu F, Lomneth BR, Cai S , et al. Role of zinc in the structure and Toxin activity of botulinum neurotoxin. *Biochemistry* 1998; 37: 5267- 5278.
- Sesardic D, Melellan K, Ekong AT, et al. Refinement and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic botulinum type A toxin. *Pharmacol Toxicol* 1996; 78: 283- 288.
- Ahnert-Higer G, Bigalke H. Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning. *Prog Neurol* 1995; 46: 83- 96.
- Cammack R, Joannou CL, Cui X, et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica Biophysica Acta* 1999; 1411: 475- 488.
- Wictome M, Newton AK, Jameson K, et al. Development of *in vitro* assays for the detection of botulinum toxins in foods. *FEMS Immun Med Microbiol* 1999; 24: 319- 323.
- Panikov NS. *Microbial growth kinetics*. London, United Kingdom: Chapman and Hall Ltd; 1995: 378.
- Walker JM. The protein protocols. New Jersey: Handbook Human Press; 1996: 7.

- 17- Reed JL, Muench H A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. Am J Hygiene 1938; 27 (3): 493 – 497.
- 18- Pearce B, Borodic EG, First RE, et al. Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay. Toxicol Appl Pharmacol 1994; 128: 69 –77.
- 19- Sugiyama H, Moberg JL, Messer LS. Improved procedure for crystallization of *Clostridium botulinum* type A Toxin complexes. Appl Environ Microbiol 1977; 33: 963– 966.
- 20- Moberg JL, Sugiyama H. Affinity chromatography purification of type A Botulinum Neurotoxin from crystalline toxin complex. Appl Environ Microbiol 1978; 35(5): 878- 880.
- 21- Lamanna C, Mcelroy EO, Usnr LT, et al. The purification and crystallization of *Clostridium botulinum* type A toxin. Science 1946; 103(2681): 613 – 616.
- 22- Sugii S, Sakaguchi G. Molecular construction of *Clostridium Botulinum* type A toxin. Infect Immun 1975; 12(6): 1262- 1270.
- 23- Call JE, Cook PH, Miller AJ. In situ characterization of *Clostridium botulinum* neurotoxin synthesis and export. J Appl Bacteriol 1995; 79: 257 – 263.
- 24- Reames RH, Kadull JP, Housewright DR, et al. Studies on botulinum toxoid, type A and B: III. Immunization of man. J Immunol 1945; 55: 309 – 324.
- 25- Walker ST. Sanders text and review series; Microbiology. Philadelphia: WB Sanders Company; 1998: 272– 274.
- 26- Ohishi I. Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type A and B Toxins from different strains. Infect Immun 1984; 43(2): 487- 490.
- 27- Krysinski EP, Sugiyama H. Nature of intercellular type A botulinum neurotoxin. Appl Environ Microbiol 1981; 41(3): 675 – 678.
- 28- Inoue K. Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin. Infect Immun 1996; 64(5): 1586 – 1594.
- 29- Brin MF. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity and immunology. Muscle Nerve Suppl 1997; 6: S146 –68.