Original Article

Evaluation of Antibodies Produced against Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* for Rapid Detection of Cholera

Mohammad Reza Akbari[1], Ali Ahmadi[2], Jafar Salimian[3*]

1- M.Sc., Department of Biology, Faculty of Basic Science, IHU University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 6618634683, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: Jafar.salimian@gmail.com

Received: 29/May/2015, Accepted: 18/Dec/2015

Abstract

Objective: Cholera is an endemic disease in Iran. Early detection, especially in times of disease outbreaks, is of vital importance. The antibody against the lipopolysaccharide (LPS) is an important method for bacterial detection. This study intends to extract and purify the LPS of *Vibrio cholerae* and evaluate the cholera antibody for detection purposes.

Methods: *Vibrio cholerae* was cultured in tryptone extract medium. LPS was extracted by the hot phenol water method, purified, and dialyzed. We measured the LPS protein and sugar content, purity, and biological activity. Antibodies were produced by injection of the killed bacteria with Freund's complete adjuvant into rabbits and then the LPS was injected three times with Freund's incomplete adjuvant. After the last booster, blood samples were taken. We used ELISA to determine the antibody titers against the Inaba and Ogawa serotypes, the LPS of these serotypes, and several other similar bacteria.

Results: The amount of protein in the purified LPS was approximately zero and sugar was 0.5 mg/ml. The LPS had a titer activity of 1024, and consisted of three bands (5.2, 4, and 5.14 KD). Antibodies produced by the rabbits identified the bacterial Inaba and Ogawa serotypes, and the purified LPS. Ogawa and Inaba serotypes cross-react with each other but not with other species of Vibrio and other bacteria. The LPS antibody titer against the Ogawa serotype was 1:32000, whereas for Inaba it was 1:16000.

Conclusion: Due to the low cost of production, high sensitivity, and importance of cholera diagnosis in Iran, the antiserum produced in this study can be used as a tool for early screening of cholera and discrimination of O1 strains from non-O1 strains in immunologic tests.

Keywords: *Vibrio cholerae*, LPS, Polyclonal antibodies, Rapid detection

Pathobiology Research, Vol. 18 (2015-2016), No. 4, Pages: 23-31

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

مقاله اصیل

ارزیابی آنتی‌بادی تولید شده علیه لیپو پلی‌ساکارید ویبریو کلرا به منظور تشخیص سریع وبا

محمدرضا اکبری[1]، علی احمدی[2]، جعفر سلیمیان[3]*

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

۲-استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۶۶۱۸۶۳۴۶۸۳، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم، ساختمان پژوهشگاه، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی

Email: Jafar.salimian@gmail.com

دریافت مقاله: ۹۴/۰۳/۰۹ پذیرش مقاله: ۹۴/۰۹/۲۸

چکیده

هدف: ایران یکی از کانون‌های بومی وبا بوده و تشخیص سریع به‌ویژه در مواقع طغیان بیماری، اهمیت حیاتی دارد. استفاده از آنتی‌بادی علیه اجزای لیپو پلی‌ساکارید یکی از روش‌های مهم تشخیص باکتری است. هدف این مطالعه، استخراج و تخلیص لیپو پلی‌ساکارید ویبریو کلرا و ارزیابی آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آن به منظور تشخیص وبا است.

مواد و روش‌ها: ویبریو کلرا تهیه و در محیط عصاره تریپتون کشت داده شد. لیپو پلی‌ساکارید به روش فنل داغ-آب، استخراج، تخلیص و دیالیز شد و میزان پروتئین، قند، خلوص، و فعالیت زیستی آن اندازه‌گیری شد. برای تولید آنتی‌بادی، ابتدا باکتری کشته شده همراه با ادجوانت کامل به خرگوش تزریق شد و سپس طی سه نوبت، لیپو پلی‌ساکارید همراه با ادجوانت ناقص فروند تزریق شد. پس از تزریق آخرین یادآور، خون‌گیری به عمل آمد و میزان آنتی‌بادی علیه پیکر سروتیپ‌های اینابا، اگاوا باکتری، علیه لیپو پلی‌ساکارید سروتیپ‌های اینابا و اگاوا و علیه چندین باکتری مشابه دیگر با روش الایزا تعیین شد.

نتایج: میزان پروتئین در لیپو پلی‌ساکارید تخلیص شده در حد صفر، قند آن ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، تیتر فعالیت آن ۱۰۲٤ و دارای سه باند ۵/۲، ٤ و ۵/۱٤ کیلودالتونی بود. آنتی‌بادی‌های تهیه شده در خرگوش، قادر به شناسایی باکتری سروتیپ اگاوا و اینابا و همچنین لیپو پلی‌ساکارید خالص بود. آنتی‌سرم علیه سروتیپ اگاوا و اینابا قادر به واکنش متقاطع علیه یکدیگر بودند اما با سایر گونه‌های ویبریو و نیز سایر باکتری‌ها واکنش نشان ندادند. تیتر آنتی‌بادی علیه لیپو پلی‌ساکارید برای سروتیپ اگاوا ۱:۳۲۰۰۰ و برای سروتیپ اینابا ۱:۱٦۰۰۰ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به هزینه کم تولید و حساسیت بالا و نظر به اهمیت و لزوم تشخیص بیماری وبا در کشور، می‌توان از آنتی‌سرم تولید شده در این مطالعه به‌عنوان ابزار تشخیص اولیه در تشخیص وبا و افتراق سویه‌های ۰۱ از غیر ۰۱ در غالب آزمون‌های ایمنولوژی استفاده نمود.

کلیدواژگان: ویبریو کلرا، لیپو پلی‌ساکارید، تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال، تشخیص سریع

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۴، صفحات: ۲۳-۳۱

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

مقدمه

بیماری وبا یکی از بیماری‌های عفونی مهم دنیا است و از طریق آب و مواد غذایی آلوده ایجاد می‌شود. عامل این بیماری ویبریو کلرا (*Vibrio cholerae*) و منشأ آن آسیای جنوب شرقی است. از بین ۲۰۰ سروتایپ، وبا توسط سویه‌های مولد سم (Toxigenic) از دو سروگروه ویبریو کلرای ۰۱ و ۰۱۳۹ ایجاد می‌شود. نوع ۰۱ بر اساس آنتی‌ژن‌های A و B و C در ساختمان لیپو پلی‌ساکارید، به سه سروتایپ اینابا (Inaba)، اگاوا (Ogawa) و هیکوجیما (Hikojima)، و بر اساس بیوتایپ، به دو نوع کلرا (کلاسیک) و التور (Eltor) تقسیم می‌شود [۱]. اگرچه تاکنون هفت همه‌گیری جهانی وبا (Pandemic cholera) در دنیا اتفاق افتاده ولی امروزه وبا بیشتر در کشورهای در حال توسعه دیده می‌شود. ایران به‌عنوان یکی از کانون‌های بومی (Endemic) وبا به‌شمار رفته و در سال‌های گذشته، همه‌گیری‌های متعددی از وبا را شاهد بوده است. مجاورت ایران با هند، پاکستان و افغانستان یکی از دلایل عمده تبدیل ایران به یک کانون بومی وبا است [۲]. اولین اپیدمی وبای التور در ایران در سال ۱۳۵٤ بوده و پس از آن ۹ بار به اوج خود رسیده است. از آن زمان تاکنون، مطالعات متعددی در مورد جداسازی باکتری عامل و تعیین خصوصیات سرولوژی و مولکولی در ایران منتشر شده است و در سال‌های اخیر بیشترین موارد وبا بیوتایپ التور و سروتایپ اگاوا بوده است [۳-۷]. در ایران طبق دستورالعمل‌های WHO، از روش مشاهده لام مستقیم، محیط انتقالی کری بلیر (Cary-Blair transport medium) و محیط کشت تیوسولفات سیترات بایل سوکروز (Thiosulphate-citrate-bile salt-sucrose agar: TCBS) استفاده می‌شود. تشخیص باکتری از طریق روش کشت نسبتاً مشکل است زیرا ویبریو کلرا به pH اسیدی به شدت حساس است و رشد آن در محیط کشت به راحتی توسط میکروفلور روده مهار می‌شود؛ بنابراین نیاز به استفاده از محیط غنی‌کننده آب پپتونه قلیایی و نیز آزمون‌های بیوشیمیایی متعدد وجود دارد. از طرفی روش کشت، مدت زمان زیادی نیاز داشته و تجربه بالایی نیز می‌طلبد [۸]. با توجه به این‌که تشخیص دقیق باکتری در کوتاه‌ترین زمان ممکن، بسیار کلیدی است، از کیت‌های تشخیص سریع و بدون نیاز به کشت بر مبنای روش‌های مولکولی و روش‌های ایمنولوژیک برای تشخیص وبا استفاده می‌شود [۹]. برای انجام آزمون‌های تشخیص ایمنولوژیک بر پایه آنتی‌بادی، داشتن یک کاندیدای آنتی‌ژن مناسب و اختصاصی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. در کنار سایر آنتی‌ژن‌ها، یکی از آنتی‌ژن‌های مهم و اختصاصی ویبریو کلرا، لیپو پلی‌ساکارید است که آنتی‌بادی علیه آن (آنتی‌ژن‌های A، B، C) برای تشخیص باکتری در نمونه‌های بالینی در روش‌های مختلف از جمله ایمنوفلورسانس (Immunofluorescence) و الایزا (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA) به‌کار می‌رود [۱۰-۱۲]. هدف این مطالعه، استخراج و تخلیص لیپو پلی‌ساکارید ویبریو کلرا و ارزیابی آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده علیه آن به‌منظور تشخیص ویبریو کلرا است.

روش بررسی

باکتری مورد استفاده

ویبریو کلرا ۰۱ سروتیپ‌های اگاوا و اینابا از آزمایشگاه مرجع تهیه و برای اطمینان از خالص بودن، با استفاده از روش‌های استاندارد باکتریولوژیک شامل کشت روی محیط اختصاصی TCBS و تعیین هویت بیوشیمیایی و سپس با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی ۰۱ تأیید شد.

تهیه آنتی‌ژن

ویبریو کلرا در محیط تریپتیک سوی براث (Trptic soy broth) با هوادهی مناسب و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. سپس برای کشتن باکتری‌ها آن‌ها را برای مدت نیم ساعت با فرمالین ۱/۵ درصد مجاور و پس از آن با PBS (Phosphate buffered saline) دو بار

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

شستشو شد. سپس به‌مدت یک ساعت در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

تهیه لیپو پلی‌ساکارید

برای تهیه لیپو پلی‌ساکاریداز روش وستفال (Westphal) و همکاران استفاده شد [۱۳]. بدین منظور باکتری ویبریو کلرا سروتیپ‌های اینابا و اگاوا به‌طور جداگانه در محیط عصاره تریپتون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با هوادهی مناسب کشت داده شد. سپس باکتری‌ها با سانتریفوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه جداسازی و با PBS دو بار شستشو داده شد و در آب مقطر سوسپانسه شد. سپس هم حجم آن، فنل۹۰ درصد افزوده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٦٨ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لایه لیپو پلی‌ساکارید از پروتئین‌ها جدا و در آب مقطر سوسپانسه شد. برای رسوب‌دهی لیپو پلی‌ساکاریداز سانتریفوژ با دور بالا (۱۰۰۰۰۰ دور در دقیقه) به‌مدت یک شب استفاده شد. آنگاه رسوب ژل مانند لیپو پلی‌ساکارید جدا و در آب مقطر حل شد و در مقابل آب مقطر به‌مدت ٢٤ ساعت دیالیز و در نهایت نمونه‌ها لیوفیلیزه (Lyophilized) شد که پودر سفید رنگ به‌دست آمد.

سنجش میزان پروتئین و قند لیپو پلی‌ساکارید

غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از لیپو پلی‌ساکارید در آب مقطر تهیه شد. مقدار قند نمونه‌ها با استفاده از روش فنل-سولفوریک اسید سنجش شد. بدین منظور به یک میلی‌لیتر نمونه، مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد فنل اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ را به نمونه‌ها افزوده شد که در صورت وجود قند رنگ نمونه به سمت رنگ نارنجی تغییر می‌یافت. پس از ٤٥ دقیقه و با تثبیت رنگ قهوه‌ای مایل به زرد، میزان جذب نور با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٨٥ نانومتر خوانده شد. اعداد حاصل از دستگاه روی منحنی استاندارد گلوکز منتقل شد و غلظت قند معادل آن‌ها، قند بر حسب میلی‌گرم بر گرم، به‌دست آمد [۱۳]. میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد سنجیده شد. بدین منظور یک میلی‌لیتر از محلول برادفورد به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه فوق‌الذکر افزوده شد که در صورت وجود پروتئین، رنگ محلول به آبی تغییر می‌یافت. سپس میزان جذب نور با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. اعداد حاصل از دستگاه بر روی منحنی استاندارد آلبومین سرم گاو منتقل شد و غلظت پروتئین معادل بر حسب میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به‌دست آمد.

بررسی خلوص لیپو پلی‌ساکارید

به‌منظور بررسی خلوص، نمونه‌های لیپو پلی‌ساکارید با استفاده از روش تریسین/SDS-PAGE (Tricin/Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی شد [١٤].

بررسی فعالیت زیستی لیپو پلی‌ساکارید

از روش هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) گلبول‌های قرمز خون خرگوش استفاده شد [١٤]. بدین منظور غلظت ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر از لیپو پلی‌ساکارید در PBS تهیه شد. سپس در چاهک‌های V شکل میکروپلیت (NUNC، دانمارک) ۵۰۰ میکرولیتر از لیپو پلی‌ساکارید ریخته و توالی رقت‌های دو برابر در PBS در چاهک‌های بعدی تهیه شد. آن‌گاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱ درصد گلبول قرمز خرگوش به آن افزوده شد. عکس آخرین چاهک هماگلوتیناسیون به‌عنوان تیتر فعالیت محاسبه شد.

تهیه آنتی‌سرم

ابتدا 10^5 باکتری کشته شده با حرارت همراه با ادجوانت کامل فروند (Freund's complete adjuvant) به زیر جلد خرگوش سفید نیوزلندی با وزن تقریبی دو کیلوگرم تزریق شد. سپس در سه نوبت و هر بار مقدار ۱۰۰ میکروگرم از

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

لیپو پلی‌ساکارید همراه با ادجوانت ناقص فروند به زیر جلد خرگوش‌ها تزریق شد. این تزریقات به فاصله دو هفته انجام شد. در فواصل تزریق و در انتهای تزریقات خون‌گیری به عمل آمد.

ELISA برای تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه باکتری

ابتدا باکتری‌های ویبریو کلرا سروتیپ اگاوا، ویبریو کلرا سروتیپ اینابا، ویبریو کلرا غیر سروتیپ ۰۱ (NAG)، و همچنین جنس‌های سالمونلا (*Salmonella*)، شیگلا (*Shigella*)، سیتروباکتر (*Citrobacter*)، و اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) در محیط تریپتیک سوی براث کشت داده شده و غلظت ۶×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر در بافر PBS (pH ۷/۲) تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها به هر چاهک اضافه شد و سپس میکروپلیت به‌مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شستشو با بافر توین ۲۰ (Tween 20) (۰/۰۵ درصد) PBST (PBS-Tween) در بین هر مرحله صورت گرفت. میکروپلیت با PBST حاوی ۳ درصد ژلاتین مسدود شد و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سرم مورد نظر از رقت ۱:۱۰۰۰ تا ۱:٦٤۰۰۰ در PBST رقیق و در چاهک‌ها قرار گرفت و میکروپلیت به‌مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، رقت مناسب (۱:۱۲۰۰۰) از آنتی‌بادی کونژوگه (Anti Rabbit IgG HRP conjugated) در PBST تهیه شد و۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا [۲ میلی‌گرم OPD (o-Phenylenediamine Dihydrochloride) در ۵ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات (pH ۵) حاوی ۲/۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد] به هر چاهک اضافه شد؛ با ایجاد رنگ زرد، واکنش با اسید سولفوریک یک مولار متوقف و جذب در ٤۹۰ نانومتر خوانده شد. در تمامی آزمایش‌ها از سرم خرگوش سالم به‌عنوان شاهد استفاده شد.

ELISA برای تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه لیپو پلی‌ساکارید

ابتدا غلظت ۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر از لیپو پلی‌ساکارید در بافر PBS تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر چاهک ریخته شد. سپس درب پلیت برداشته شد و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب در گرمخانه قرار گرفت تا بافر کاملاً تبخیر شود (روش خشک کردن). بقیه مراحل همانند بالا انجام گرفت.

کنترل مثبت

لیپو پلی‌ساکارید ویبریو کلرا سروتایپ اینابا (LO383) از شرکت Sigma (آمریکا) تهیه شد و از آن در تمامی مراحل آزمایش به‌عنوان شاهد استفاده شد.

نتایج

خصوصیات لیپو پلی‌ساکارید

هر یک میلی‌گرم لیپو پلی‌ساکارید تخلیص شده با روش وستفال دارای۰/۵ میلی‌گرم پلی‌ساکارید بود و میزان پروتئین آن در حد ناچیز (تقریباً صفر) برآورد شد.

تریسین/ SDS-PAGE

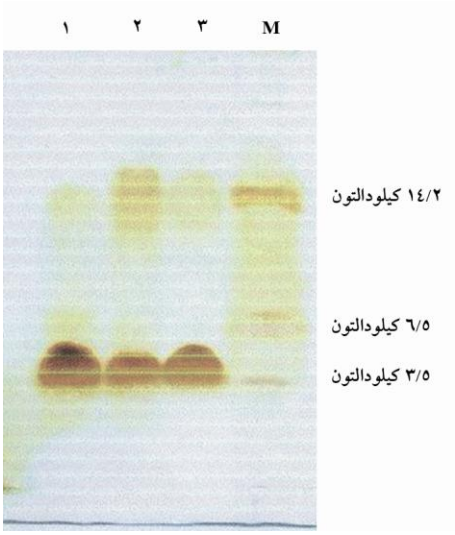
پس از رنگ‌آمیزی با پریودیک اسید-نیترات نقره (Periodic acid-silver nitrate)، لیپو پلی‌ساکارید استخراج شده مانند نمونه کنترل (لیپو پلی‌ساکارید اینابا شرکت Sigma، آمریکا) دارای سه باند اصلی به وزن‌های ۵/۲، ٤ و ۱٤/۵ کیلودالتون بود (شکل ۱).

فعالیت زیستی لیپو پلی‌ساکارید

با استفاده از روش هماگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز خرگوش، تیتر فعالیت لیپو پلی‌ساکارید استخراج شده همانند

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

نمونه کنترل ۱۰۲٤ به‌دست آمد.

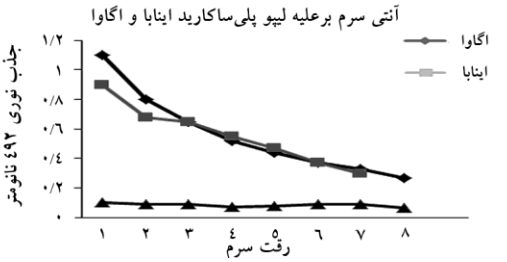


شکل ۱ رنگ‌آمیزی پریودیک اسید-نیترات نقره لیپو پلی‌ساکارید؛ ستون اول) لیپو پلی‌ساکارید اینابا، ستون دوم) لیپو پلی‌ساکارید اینابا شرکت Sigma (آمریکا)، ستون سوم) لیپو پلی‌ساکارید اگاوا، ستون چهارم) نشانگر وزن مولکولی (باند ٥/۲ کیلودالتون در ستون اول به‌صورت ضعیف مشاهده می‌شود ولی در ستون‌های ۲و ۳ بسیار کمرنگ بود و در عکس مشاهده نمی‌شود)

آنتی‌سرم

پس از خون‌گیری و تهیه سرم از ورید مارژینال (Marginal vein) گوش خرگوش، تیتر آنتی‌بادی علیه لیپو پلی‌ساکارید با روش ELISA غیر مستقیم بررسی شد. آنتی‌بادی تولید شده علیه لیپو پلی‌ساکارید سروتیپ اگاوا، به خوبی این باکتری را شناسایی کرد و تیتر آن ۱/٦٤۰۰۰ به‌دست آمد. همچنین آنتی‌بادی تولید شده علیه لیپو پلی‌ساکارید سروتیپ اینابا نیز سروتیپ اینابا را شناسایی کرد و تیتر آن ۱/۳۲۰۰۰ به‌دست آمد (شکل ۲). نتایج نشان داد آنتی‌سرم علیه سروتیپ اگاوا و سروتیپ اینابا قادر به واکنش متقاطع و شناسایی یکدیگر بودند. واکنش متقاطع از تیتر ۱/۱۲۰۰۰ و پایین‌تر قابل مشاهده بود و در تیترهای بالاتر دیده نشد. همچنین آنتی‌سرم سروتیپ اگاوا و اینابا با ویبریو کلرا غیر ۰۱، سالمونلا، شیگلا، اشریشیا کولی و سیتروباکتر صرفاً در تیترهای بسیار پایین (۱/٥۰۰۰) واکنش متقاطع نشان داد و در تیترهای بالاتر هیچ واکنشی دیده نشد. از طرف دیگر؛ آنتی‌سرم علیه سروتیپ اگاوا و اینابا لیپو پلی‌ساکارید تخلیص شده سروتایپ مربوط به خود را به خوبی شناسایی کرد و به‌ترتیب در تیترهای ۱:۳۲۰۰۰ و ۱:۱٦۰۰۰ مثبت شد (شکل ۳). هر دو آنتی‌سرم با یکدیگر واکنش متقاطع دادند و هر دوی آن‌ها با لیپو پلی‌ساکارید اینابا شرکت Sigma (آمریکا) واکنش دادند و در نتیجه واکنش آنتی‌سرم اینابا با این لیپو پلی‌ساکارید قوی‌تر ظاهر شد.

شکل ۲ نتیجه ELISA آنتی‌سرم تهیه شده با باکتری ویبر کلرا اگاوا و اینابا



شکل ۳ نتیجه ELISA آنتی‌سرم تهیه شده با لیپو پلی‌ساکارید ویبر کلرا اگاوا و اینابا

بحث

با توجه به این‌که بیماری وبا یک بیماری بومی ایران محسوب می‌شود و در کنار کشورهای کانون وبا قرار دارد، وجود روش‌های تشخیص سریع و دقیق تشخیص این باکتری در موارد همه‌گیری از اهمیت حیاتی برخوردار است. اگرچه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

روش های مولکولی حساسیت و اختصاصیت بالایی دارند ولی معمولاً نیاز به پرسنل آموزش دیده، دستگاه پیشرفته و هزینه بالا دارند. در مقابل، روش‌های ایمونولوژی همانند آگلوتیناسیون لاتکس از حساسیت و ویژگی مناسبی برخوردار است و با هزینه کم، سهولت انجام و تفسیر و سرعت پاسخ‌دهی بالا به‌خصوص برای آزمایش‌های غربال‌گری مناسب است [۸]. آنتی‌ژن کاندیدای تشخیص یک عامل عفونی باید تا حد امکان منحصر به فرد باشد و کمترین واکنش متقاطع را با سایر سروتیپ‌ها و باکتری‌های هم‌خانواده داشته باشد. برای تشخیص ویبریو کلرا از آنتی‌ژن‌های اختصاصی موجود در ساختار لیپو پلی‌ساکارید یعنی آنتی‌ژن ABC ناحیه پلی‌ساکاریدی استفاده می‌شود که آنتی‌ژن A، آنتی‌ژن اختصاصی گروه و آنتی‌ژن B و C، اختصاصی سروگروه است [۱۵]. در این مطالعه، آنتی‌ژن اختصاصی یا همان لیپو پلی‌ساکارید دیواره باکتری ویبریو کلرا استخراج و تخلیص شد. لیپو پلی‌ساکارید استخراج شده با روش وستفال در مقایسه با نمونه تجاری لیپو پلی‌ساکارید اینابا محصول شرکت Sigma (آمریکا) (LO383) میزان پروتئین کمتری دارد. میزان پروتئین نمونه تجاری بین ۱-۱۰ درصد گزارش شده اما پروتئین نمونه تخلیص شده حاضر در حد صفر است. لیپو پلی‌ساکارید تخلیص شده توسط ویلنوو (Villeneuve) دارای ۱ درصد پروتئین است [۱٦]. پایین بودن میزان پروتئین در نمونه یک مزیت محسوب می‌شود؛ زیرا پروتئین در مقایسه با لیپید و پلی‌ساکارید، ایمنی‌زای قوی‌تری است و می‌تواند در تهیه آنتی‌سرم تداخل ایجاد کند. در الکتروفورز نمونه‌های تخلیص شده، دو باند اصلی دیده شد که با نمونه تجاری Sigma (آمریکا) کاملاً مطابقت دارد. فعالیت زیستی لیپو پلی‌ساکارید تخلیص شده نیز با روش هماگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز Muriral بررسی شد [۱۷] و نتایج نشان داد که نمونه تخلیص شده همانند نمونه تجاری دارای فعالیت زیستی است و در حین استخراج و تخلیص علاوه بر ساختمان، فعالیت زیستی لیپو پلی‌ساکارید کاملاً حفظ شده است. با توجه به این‌که در ساختار لیپو پلی‌ساکارید، پروتئین وجود ندارد، امکان تولید آنتی بادی از کلاس IgG علیه LPS نیز وجود ندارد. به همین دلیل ابتدا باید باکتری کامل را تزریق کرد و سپس لیپو پلی‌ساکارید تزریق شود تا امکان سوئیچ آنتی بادی از کلاس IgM به IgG فراهم شود. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد آنتی‌سرم تولید شده علیه لیپو پلی‌ساکارید سروتیپ اگاوا، در آزمون ELISA قادر به شناسایی هر دو سروتیپ اگاوا و اینابا است؛ اما سروتیپ اگاوا را با تیتر بالاتری شناسایی می‌کند. یکی از دلایل احتمالی این است که سروتیپ اگاوا دارای هر دو آنتی‌ژن A و B (B مختص اگاوا و A اختصاصی گروه) است؛ بنابراین این آنتی‌بادی توانسته است علاوه بر آنتی‌ژن A، آنتی‌ژن B را نیز شناسایی و در نتیجه تیتر بالاتری ایجاد کند. در مقابل، همین آنتی‌بادی هنگامی که با سروتیپ اینابا مواجه می‌شود، چون این سروتیپ فاقد آنتی‌ژن B است، بنابراین فقط با آنتی‌بادی‌های ضد A وارد واکنش می‌شود و در نتیجه تیتر پایین‌تری ایجاد می‌کند. مطلب ذکر شده در مورد آنتی‌سرم تولید شده علیه لیپو پلی‌ساکارید سروتیپ اینابا نیز صادق است. این آنتی‌سرم واجد آنتی‌بادی ضد سروتیپ آنتی‌ژن C و آنتی‌بادی ضد سروگروه A است و با سروتیپ اینابا با تیتر بالاتر و با سروتیپ اگاوا با تیتر پایین‌تر واکنش می‌دهد. هر دو آنتی‌سرم تولید شده (آنتی‌اینابا، آنتی‌اگاوا) می‌توانند با لیپو پلی‌ساکارید اینابا تجارتی Sigma (آمریکا) واکنش دهند. همچنین آنتی‌اینابا با لیپو پلی‌ساکارید اینابا تجارتی بهتر از آنتی‌اگاوا واکنش می‌دهد که خود حکایت از درستی استخراج و تخلیص لیپو پلی‌ساکارید در آزمایشگاه دارد. آنتی‌سرم به‌دست آمده با باکتری ویبریو کلرا ۰۱، در مقایسه با لیپو پلی‌ساکارید واکنش بهتری دارد. این نشان می‌دهد در مراحل اولیه ایمن‌سازی خرگوش با استفاده از جسم باکتری، سیستم ایمنی علاوه بر لیپو پلی‌ساکارید سایر آنتی‌ژن‌های پروتئینی سطح سلول را نیز شناسایی کرده و علیه آن‌ها نیز آنتی‌بادی تولید کرده است. آنتی‌سرم‌های تولیدی در تیتر بالا فقط با ویبریو کلرا سروتایپ اینابا و اگاوا واکنش داشته و با ویبریو

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

کلرا غیر ۰۱ و سایر باکتری‌ها نظیر سالمونلا، شیگلا اشریشیا کولی و سیتروباکتر واکنش نداده است و فقط در تیترهای بسیار پایین واکنش متقاطع قابل مشاهده است. آنتی‌بادی‌های تولید شده در این مطالعه از نوع پلی‌کلونال است و اگرچه در مقایسه با آنتی‌بادی های منوکلونال، اختصاصیت کمتری دارد؛ اما با توجه به هزینه کم تولید و حساسیت بالا روش، در صورت تولید در داخل کشور، می‌تواند به‌عنوان ابزار تشخیص اولیه در موارد همه‌گیری یا تک‌گیری وبا و افتراق بین سویه‌های ۰۱ از غیر ۰۱ و سایر باکتری‌های هم‌خانواده به‌کار گرفته شود.

با توجه به اهمیت و لزوم تشخیص بیماری وبا در کشور، می‌توان از آنتی‌سرم تولید شده در این مطالعه برای تشخیص ویبریو کلرای ۰۱ در غالب آزمون‌های ELISA، ایمنوفلورسانس، و آگلوتیناسیون سریع استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر محمود تولایی برای همکاری و پشتیبانی در اجرای پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic Vibrio cholerae. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(4): 1301-14.

[2] Azizi M, Azizi F. History of Cholera Outbreaks in Iran during the 19(th) and 20(th) Centuries. Middle East J Dig Dis 2010; 2(1): 51-5.

[3] Khazaei HA, Rezaei N, Bagheri GR, Moin AA.Khazaei HA, Rezaei N, Bagheri GR, Moin AA. A six-year study on Vibrio cholerae in southeastern Iran. Jpn J Infect Dis 2005; 58(1): 8-10.

[4] Pourshafie M, Grimont F, Kohestani S, Grimont PA. A molecular and phenotypic study of Vibrio cholerae in Iran. J Med Microbiol 2002; 51(5): 392-8.

[5] Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Rahgerdi AK. Rapid screening of toxigenic vibrio cholerae O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. Iran Biomed J 2008; 12(1): 15-21.

[6] Khazaei HA, Rezaei N, Bagheri GR, Mahmoudi M, Moin AA, Dankoub MA, Gazeran A. The epidemiology of Vibrio cholerae in Zabol city, Southeast of Iran. Arch Iranian Med 2005; 8(3):197–201.

[7] Aliabad NH, Bakhshi B, Pourshafie MR, Sharifnia A, Ghorbani M. Molecular diversity of CTX prophage in Vibrio cholerae. Lett Appl Microbiol 2012; 55(1): 27-32.

[8] Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholera. Centers for Disease Control and Prevention. VI. Laboratory Identification Of Vibrio Cholerae. Page 17. Available at: http://www.cdc.gov/cholera/pdf/Laboratory-Methods-for-the-Diagnosis-of-Vibrio-cholerae-chapter-6.pdf

[9] Dick MH, Guillerm M, Moussy F, Chaignat CL. Review of two decades of cholera diagnostics--how far have we really come? PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(10): e1845.

[10] Rashidiany J , Kamaly M , Ranjbar R , Javady HR , Hosaeny H. Induction of Rat Antibody Against Surface Proteins (OmpW) of Vibrio cholerae O1. Iranian Journal of Infectious Diseases 2012; 17(58): 1-6. (Persian)

[11] Martínez-Govea A, Ambrosio J, Gutiérrez-

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]

Cogco L, Flisser A. Identification and strain differentiation of Vibrio cholerae by using polyclonal antibodies against outer membrane proteins. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8(4): 768-71.

[12] Adams LB, Henk MC, Siebeling RJ. Detection of Vibrio cholerae with monoclonal antibodies specific for serovar O1 lipopolysaccharide. J Clin Microbiol 1988; 26(9): 1801-9.

[13] Westphal O, Jann JK. Bacterial lipopoly-saccharide extraction with phenol-water and further application of the procedure. Methods Carbohydr Chem 1965; 5: 83-91.

[14] Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. Nat Protoc 2006; 1(1): 16-22.

[15] Gustafsson B, Rosén A, Holme T. Monoclonal antibodies against Vibrio cholerae lipopolysaccharide. Infect Immun 1982; 38(2): 449-54.

[16] Villeneuve S, Souchon H, Riottot MM, Mazie JC, Lei P, Glaudemans CP, Kovác P, Fournier JM, Alzari PM. Crystal structure of an anti-carbohydrate antibody directed against Vibrio cholerae O1 in complex with antigen: molecular basis for serotype specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(15): 8433-8.

[17] Alam M, Miyoshi S, Tomochika K, Shinoda S. Hemagglutination is a novel biological function of lipopolysaccharide (LPS), as seen with the Vibrio cholerae O139 LPS. Clin Diagn Lab Immunol 1997; 4(5): 604-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-19]