

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

Mohammad Reza Akbari¹, Ali Ahmadi², 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

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

محمد رضا اکبری^۱، علی احمدی^۲، جعفر سلیمیان^{۳*}

- 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: تهران، کدپستی: ۶۶۱۸۶۳۴۶۸۳، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم، ساختمان پژوهشگاه، مرکز تحقیقات

آسیب‌های شیمیایی

Email: Jafar.salimian@gmail.com

پذیرش مقاله: ۹۴/۰۹/۲۸

دریافت مقاله: ۹۴/۰۳/۰۹

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 تریتون 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 فرزند تزریق شد. پس از تزریق آخرین یادآور، خون‌گیری به عمل آمد و میزان آنتی‌بادی علیه پیکر سروتیپ‌های اینابا، آگاو باکتری، علیه لیپو پلی‌ساکارید سروتیپ‌های اینابا و آگاو 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، تیترا فعالیت آن ۱۰۲۴ و دارای سه باند ۵/۲، ۴ و ۵/۱۴ کیلودالتونی بود. آنتی‌بادی‌های تهیه شده در خرگوش، قادر به شناسایی باکتری سروتیپ آگاو و اینابا و همچنین لیپو پلی‌ساکارید خالص بود. آنتی‌سرم علیه سروتیپ آگاو و اینابا قادر به واکنش متقاطع علیه یکدیگر بودند اما با سایر گونه‌های ویبریو و نیز سایر باکتری‌ها واکنش نشان ندادند. تیترا آنتی‌بادی علیه لیپو پلی‌ساکارید برای سروتیپ آگاو ۱:۳۲۰۰۰ و برای سروتیپ اینابا ۱:۱۶۰۰۰ 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 ایمونولوژی استفاده نمود.

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

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

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 سرورگروه ویبریو کلرای ۰۱ و ۰۱۳۹ ایجاد می‌شود. نوع ۰۱ بر اساس آنتی‌ژن‌های A و B و C در ساختمان لیپو پلی ساکارید، 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 ۱۳۵۴ 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 سترات 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 پیتونه قلیایی و نیز آزمون‌های بیوشیمیایی متعدد وجود دارد. از طرفی روش کشت، مدت زمان زیادی نیاز

آنتی‌بادی علیه لیپوپلی ساکارید برای تشخیص وبا

داشته و تجربه بالایی نیز می‌طلبند [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 ایمونولوژیک برای تشخیص وبا استفاده می‌شود [۹]. برای انجام آزمون‌های تشخیص ایمونولوژیک 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 پلی ساکارید است که آنتی‌بادی علیه آن (آنتی‌ژن‌های A، B، C) برای تشخیص باکتری در نمونه‌های بالینی در روش‌های مختلف از جمله ایمونوفلورسانس (Immunofluorescence) و الیزا (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA) به‌کار می‌رود [۱۰-۱۲]. هدف این مطالعه، استخراج و تخلیص لیپو پلی ساکارید 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 خلص 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 برات (Tryptic soy broth) با هوادهی مناسب و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت 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

شستشو شد. سپس به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

تهیه لیپو پلی ساکارید

برای تهیه لیپو پلی ساکارید از روش وستفال (Westphal) و همکاران استفاده شد [۱۳]. بدین منظور باکتری ویبریو کلرا سروتپ های اینابا و آگاوا به طور جداگانه در محیط عصاره تریپتون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با هوادهی مناسب کشت داده شد. سپس باکتری ها 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، فنل ۹۰ درصد افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۸ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس لایه لیپو پلی ساکارید از پروتئین ها جدا و در آب مقطر سوسپانسه شد. برای رسوب دهی لیپو پلی ساکارید از سانتریفوژ با دور بالا (۱۰۰۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت یک شب استفاده شد. آنگاه رسوب ژل مانند لیپو پلی ساکارید جدا و در آب مقطر حل شد و در مقابل آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت دیالیز و در نهایت نمونه ها لیوفیلیزه (Lyophilized) شد که پودر سفید رنگ به دست آمد.

سنجش میزان پروتئین و قند لیپو پلی ساکارید

غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر از لیپو پلی ساکارید در آب مقطر تهیه شد. مقدار قند نمونه ها با استفاده از روش فنل - سولفوریک اسید سنجش شد. بدین منظور به یک میلی لیتر نمونه، مقدار ۱ میلی لیتر محلول ۵ درصد فنل اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس مقدار ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ را به نمونه ها افزوده شد که در صورت وجود قند رنگ نمونه به سمت رنگ نارنجی تغییر می یافت. پس از ۴۵ دقیقه و با تثبیت رنگ قهوه ای مایل به زرد، میزان جذب نور با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. اعداد حاصل از دستگاه روی منحنی استاندارد گلوکز منتقل شد و غلظت قند معادل آن ها، قند بر حسب میلی گرم بر گرم، به دست

آمد [۱۳]. میزان پروتئین با استفاده از روش برادفورد سنجیده شد. بدین منظور یک میلی لیتر از محلول برادفورد به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه فوق الذکر افزوده شد که در صورت وجود پروتئین، رنگ محلول به آبی تغییر می یافت. 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 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد.

بررسی خلوص لیپو پلی ساکارید

به منظور بررسی خلوص، نمونه های لیپو پلی ساکارید با استفاده از روش تریسین SDS-PAGE/ (Tricin/Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) بررسی شد [۱۴].

بررسی فعالیت زیستی لیپو پلی ساکارید

از روش هماگلوتیناسیون (Hemagglutination) گلوبول های قرمز خون خرگوش استفاده شد [۱۴]. بدین منظور غلظت ۱ میلی گرم / میلی لیتر از لیپو پلی ساکارید در PBS تهیه شد. سپس در چاهک های V شکل میکروپلیت (NUNC، دانمارک) ۵۰۰ میکرولیتر از لیپو پلی ساکارید ریخته و توالی رقت های دو برابر در PBS در چاهک های بعدی تهیه شد. آن گاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱ درصد گلوبول قرمز خرگوش به آن افزوده شد. عکس آخرین چاهک هماگلوتیناسیون به عنوان تیترا فعالیت محاسبه شد.

تهیه آنتی سرم

ابتدا ۱۰^۹ 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

ELISA برای تعیین تیتراژ آنتی‌بادی علیه لیپو

پلی ساکارید

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

کنترل مثبت

لیپو پلی ساکارید 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 پلی ساکارید

هر یک میلی‌گرم لیپو پلی ساکارید تخلیص شده با روش وستفال دارای ۰/۵ میلی‌گرم پلی ساکارید بود و میزان پروتئین آن در حد ناچیز (تقریباً صفر) برآورد شد.

تریسین / SDS-PAGE

پس از رنگ‌آمیزی با پرئودیک اسید نیترات نقره (Periodic acid-silver nitrate)، لیپو پلی ساکارید استخراج شده مانند نمونه کنترل (لیپو پلی ساکارید اینابا شرکت Sigma، آمریکا) دارای سه باند اصلی به وزن‌های ۵/۲، ۴ و ۱۴/۵ کیلودالتون بود (شکل ۱).

فعالیت زیستی لیپو پلی ساکارید

با استفاده از روش هم‌آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز خرگوش، تیتراژ فعالیت لیپو پلی ساکارید استخراج شده همانند

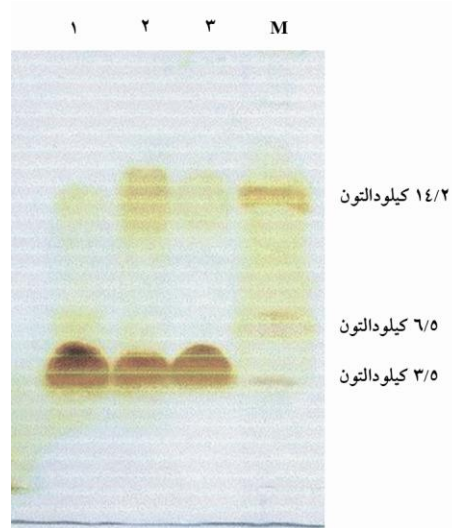
لیپو پلی ساکارید همراه با ادرجوانت ناقص فروند به زیر جلد خرگوش‌ها تزریق شد. این تزریقات به فاصله دو هفته انجام شد. در فواصل تزریق و در انتهای تزریقات خون‌گیری به عمل آمد.

ELISA برای تعیین تیتراژ آنتی‌بادی علیه باکتری

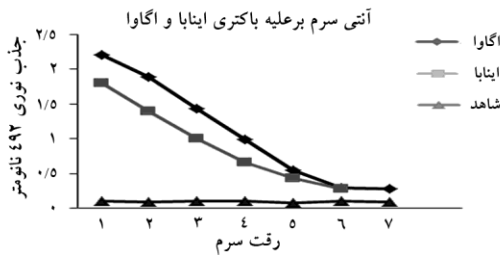
ابتدا باکتری‌های ویبریو کلرا سروتایپ آگاو، ویبریو کلرا سروتایپ اینابا، ویبریو کلرا غیر سروتایپ ۰۱ (NAG)، و همچنین جنس‌های سالمونلا (*Salmonella*)، شیگلا (*Shigella*)، سیتروباکتر (*Citrobacter*)، و اشیریشیا کلی (*Escherichia coli*) در محیط تریپتیک سوی برات کشت داده شده و غلظت 6×10^8 سلول در میلی‌لیتر در بافر PBS (pH ۷/۲) تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها به هر چاهک اضافه شد و سپس میکروپلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شستشو با بافر تویین 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 ۱:۶۴۰۰۰ در PBST رقیق و در چاهک‌ها قرار گرفت و میکروپلیت به مدت 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 و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. در تمامی آزمایش‌ها از سرم خرگوش سالم به‌عنوان شاهد استفاده شد.

نمونه کنترل ۱۰۲۴ به دست آمد.

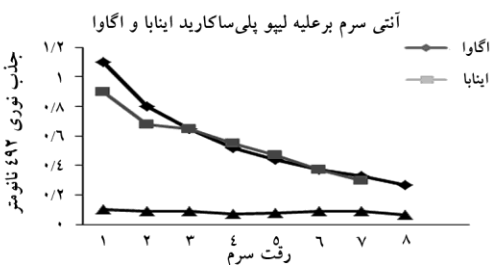
سالمونلا، شیگلا، اشريشيا کولی و سیتروباکتر صرفاً در تیتراهای بسیار پایین (۱/۵۰۰۰) واکنش متقاطع نشان داد و در تیتراهای بالاتر هیچ واکنشی دیده نشد. از طرف دیگر؛ آنتی سرم علیه سروتیپ آگاو و اینابا لیپو پلی ساکارید تخلیص شده سروتیپ مربوط به خود را به خوبی شناسایی کرد و به ترتیب در تیتراهای ۱:۳۲۰۰۰ و ۱:۱۶۰۰۰ مثبت شد (شکل ۳). هر دو آنتی سرم با یکدیگر واکنش متقاطع دادند و هر دو آن‌ها با لیپو پلی ساکارید اینابا شرکت Sigma (آمریکا) واکنش دادند و در نتیجه واکنش آنتی سرم اینابا با این لیپو پلی ساکارید قوی تر ظاهر شد.



شکل ۱ رنگ آمیزی پریودیک اسید-نیترات نقره لیپو پلی ساکارید؛ ستون اول) لیپو پلی ساکارید اینابا، ستون دوم) لیپو پلی ساکارید اینابا شرکت Sigma (آمریکا)، ستون سوم) لیپو پلی ساکارید آگاو، ستون چهارم) نشانگر وزن مولکولی (باند ۵/۲ کیلودالتون در ستون اول به صورت ضعیف مشاهده می شود ولی در ستون های ۲ و ۳ بسیار کم رنگ بود و در عکس مشاهده نمی شود)



شکل ۲ نتیجه ELISA آنتی سرم تهیه شده با باکتری ویبر کلرا آگاو و اینابا



شکل ۳ نتیجه ELISA آنتی سرم تهیه شده با لیپو پلی ساکارید ویبر کلرا آگاو و اینابا

آنتی سرم

پس از خون گیری و تهیه سرم از ورید مارژینال (Marginal vein) گوش خرگوش، تیتراژ آنتی بادی علیه لیپو پلی ساکارید با روش ELISA غیر مستقیم بررسی شد. آنتی بادی تولید شده علیه لیپو پلی ساکارید سروتیپ آگاو، به خوبی این باکتری را شناسایی کرد و تیتراژ آن ۱/۶۴۰۰۰ به دست آمد. همچنین آنتی بادی تولید شده علیه لیپو پلی ساکارید سروتیپ اینابا نیز سروتیپ اینابا را شناسایی کرد و تیتراژ آن ۱/۳۲۰۰۰ به دست آمد (شکل ۲). نتایج نشان داد آنتی سرم علیه سروتیپ آگاو و سروتیپ اینابا قادر به واکنش متقاطع و شناسایی یکدیگر بودند. واکنش متقاطع از تیتراژ ۱/۱۲۰۰۰ و پایین تر قابل مشاهده بود و در تیتراهای بالاتر دیده نشد. همچنین آنتی سرم سروتیپ آگاو و اینابا با ویبریو کلرا غیر ۰۱،

بحث

با توجه به این که بیماری وبا یک بیماری بومی ایران محسوب می شود و در کنار کشورهای کانون وبا قرار دارد، وجود روش های تشخیص سریع و دقیق تشخیص این باکتری در موارد همه گیری از اهمیت حیاتی برخوردار است. اگر چه

آنتی‌بادی علیه لیپوپلی ساکارید برای تشخیص وبا

روش های مولکولی حساسیت و اختصاصیت بالایی دارند ولی معمولاً نیاز به پرسنل آموزش دیده، دستگاه پیشرفته و هزینه بالا دارند. در مقابل، روش های ایمونولوژی همانند آگلوتیناسیون لاتکس از حساسیت و ویژگی مناسبی برخوردار است و با هزینه کم، سهولت انجام و تفسیر و سرعت پاسخ‌دهی بالا به خصوص 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 پلی ساکارید یعنی آنتی‌ژن ABC ناحیه پلی ساکاریدی 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 پلی ساکارید دیواره باکتری ویبریو کلرا استخراج و تخلیص شد. لیپو پلی ساکارید استخراج شده با روش وستفال در مقایسه با نمونه تجاری لیپو پلی ساکارید 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 پلی ساکارید تخلیص شده توسط ویلنو و (Villeneuve) دارای ۱ درصد پروتئین است [۱۶]. پایین بودن میزان پروتئین در نمونه یک مزیت محسوب می‌شود؛ زیرا پروتئین در مقایسه با لیپید و پلی ساکارید، 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 پلی ساکارید تخلیص شده نیز با روش هم‌آگلوتیناسیون 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 پلی ساکارید کاملاً حفظ شده است. با توجه به این که در

ساختار لیپو پلی ساکارید، پروتئین وجود ندارد، امکان تولید آنتی‌بادی از کلاس IgG علیه LPS نیز وجود ندارد. به همین دلیل ابتدا باید باکتری کامل را تزریق کرد و سپس لیپو پلی ساکارید تزریق شود تا امکان سوئیچ آنتی‌بادی از کلاس IgM به IgG فراهم شود. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد آنتی‌سرم تولید شده علیه لیپو پلی ساکارید سروتیپ آگاو، در آزمون ELISA قادر به شناسایی هر دو سروتیپ آگاو و اینابا است؛ اما سروتیپ آگاو را با تیترا بالاتری شناسایی می‌کند. یکی از دلایل احتمالی این است که سروتیپ آگاو دارای هر دو آنتی‌ژن A و B (B مختص آگاو و A اختصاصی گروه) است؛ بنابراین این آنتی‌بادی توانسته است علاوه بر آنتی‌ژن A، آنتی‌ژن B را نیز شناسایی و در نتیجه تیترا 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 واکنش می‌شود و در نتیجه تیترا پایین‌تری ایجاد می‌کند. مطلب ذکر شده در مورد آنتی‌سرم تولید شده علیه لیپو پلی ساکارید سروتیپ اینابا نیز صادق است. این آنتی‌سرم واجد آنتی‌بادی ضد سروتیپ آنتی‌ژن C و آنتی‌بادی ضد سروگروه A است و با سروتیپ اینابا با تیترا بالاتر و با سروتیپ آگاو با تیترا پایین‌تر واکنش می‌دهد. هر دو آنتی‌سرم تولید شده (آنتی‌اینابا، آنتی‌آگاو) می‌توانند با لیپو پلی ساکارید اینابا تجارتي Sigma (آمریکا) واکنش دهند. همچنین آنتی‌اینابا با لیپو پلی ساکارید اینابا تجارتي بهتر از آنتی‌آگاو واکنش می‌دهد که خود حکایت از درستی استخراج و تخلیص لیپو پلی ساکارید در آزمایشگاه دارد. آنتی‌سرم به دست آمده با باکتری ویبریو کلرا ۰۱، در مقایسه با لیپو پلی ساکارید واکنش بهتری دارد. این نشان می‌دهد در مراحل اولیه ایمن‌سازی خرگوش با استفاده از جسم باکتری، سیستم ایمنی علاوه بر لیپو پلی ساکارید سایر آنتی‌ژن‌های پروتئینی سطح سلول را نیز شناسایی کرده و علیه آن‌ها نیز آنتی‌بادی تولید کرده است. آنتی‌سرم‌های تولیدی در تیترا بالا فقط با ویبریو کلرا سروتیپ اینابا و آگاو واکنش داشته و با ویبریو

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

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

کلرا غیر ۰۱ و سایر باکتری‌ها نظیر سالمونلا، شیگلا اشریشیا کولی و سیتروباکتر واکنش نداده است و فقط در تیتراهای بسیار پایین واکنش متقاطع قابل مشاهده است. آنتی‌بادی‌های تولید شده در این مطالعه از نوع پلی‌کلونال است و اگرچه در مقایسه با آنتی‌بادی‌های 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.

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 cholerae*. 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-

آنتی‌بادی علیه لیپوپلی ساکارید برای تشخیص وبا

- 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 lipopolysaccharide 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.