Journal of Arak University of Medical Sciences
Volume 25, Issue 4
October & November 2022

Research Article

Preparation of Mono Specific Antiserum against Salmonella O and H antigens for Application in Agglutination and ELISA Tests

Mahnaz Ghahramani Til [1,2], Rezvaneh Sadat Fatemi [1,2], Rahman Shokri [2,*], Mahdi Banitalebi Dehkordi [3], Mahdi Paryan [2,*]

[1] Department of Biology, School of Biological Sciences, Danesh Alborz University of Qazvin
[2] Department of Research and Development, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran
[3] Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

*** Corresponding author:** Rahman Shokri, Department of Biology, School of Biological Sciences, Danesh Alborz University of Qazvin. Mahdi Paryan, Department of Research and Development, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Karaj, Iran. E-mail: mparyan@gmail.com, zsalemi@arakmu.ac.ir

DOI: 10.61186/jams.25.4.45

How to Cite this Article:
Ghahramani Til M, Fatemi RS, Shokri R, Banitalebi Dehkordi M, Paryan M. Preparation of Mono Specific Antiserum against Salmonella O and H antigens for Application in Agglutination and ELISA Tests. *J Arak Uni Med Sci*. 2022;**25**(4):45-52. DOI: 10.61186/jams.25.4.45

Received: 02 Jul 2022
Accepted: 29 May 2023
Keywords:
Salmonella
O antigen
H antigen
Specific Antiserum
Agglutination
ELISA

© 2022 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Salmonella infection (salmonellosis) is a common bacterial disease that affects the intestinal tract. Several methods like Multiplex or real-time PCR, ELISA, and Agglutination are used to identify these bacteria. However, normally rapid, cost effective and easy diagnostic methods such as agglutination test is recommended. In Iran, positive control antiserums used in diagnostic kits work based on polyvalent agglutination and are against O and H antigens. The purpose of this research was to produce specific anti-sera against O and H antigens for using in agglutination and ELISA kits.

Methods: New Zealand white rabbits were immunized by intravenous injections of inactivated bacterial O and H antigens adjusted to a cell density equivalent to a turbidity of a McFarland number 3 standard. Serum collection was performed 7 days after the last injection. Collected Antisera were tested with positive human specimens as well as cross-reaction antibodies. Absorption method was used to obtain specific anti-sera against O and H antigens. Produced Anti-O and Anti-H antibodies were mixed with bacterial H and O antigens respectively and incubated for 1 hours in 37˚c. The Mixture was centrifuged and the supernatant was collected. Furthermore, in order to use these antisera in specific kits such as ELISA, Immunofluorescence etc., purification methods like Ammonium sulphate precipitation, tangential Flow Filtration and Chromatography were performed. This study was approved by the ethics committee of Pasteur Institute of Iran (Code: IR.PII.REC.1399.006).

Results: Results of agglutination test before and after adsorption showed cross-reaction before adsorption and no cross-reaction with H and O antigens with monospecific antisera against O and H after adsorption, respectively. Moreover, high quality and quantity of mono-specific antibody was obtained after purification.

Conclusions: Serum-based assays are recommended for the timely diagnosis of the disease since these assays are specific, sensitive, inexpensive, and rapid. Therefore, the produced antiserum in the present research can be used in primary screening of salmonella infections based on agglutination tests which are cost effective and simple. In addition, purified anti-sera can be used in the development of ELISA and Immunofluorescence assays.

Copyright © *2022 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک
دوره ۲۵، شماره ۴، مهر و آبان ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

تهیه آنتی‌سرم اختصاصی (Mono Specific) برعلیه آنتی ژن O و H سالمونلا جهت استفاده در کیت‌های تشخیصی آگلوتیناسیون و الایزا

مهناز قهرمانی تیل [۱،۲]، رضوانه سادات فاطمی [۱،۲]، رحمان شکری [۲*]، مهدی بنی طالبی [۳]، مهدی پریان [۲*]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه دانش البرز، آبیک، ایران
[۲] گروه تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران
[۳] گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
* **نویسنده مسئول:** رحمان شکری، گروه تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران. مهدی پریان، گروه تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، کرج، ایران. ایمیل: shokrei@gmail.com mparyan@gmail.com

DOI: 10.61186/jams.25.4.45

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸
واژگان کلیدی:
سالمونلا
آنتی ژن O
آنتی ژن H
آنتی سرم اختصاصی
آگلوتیناسیون، الایزا

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: عفونت سالمونلا (سالمونلوزیس) یکی از شایع ترین عفونت ها بوده که بر دیواره روده اثر می گذارد. برای شناسایی این باکتری از روش های مختلفی از قبیل PCR، Multiplex PCR، الایزا و آگلوتیناسیون استفاده می شود. با اینحال معمولاً روش های تشخیصی سریع، مقرون به صرفه و آسان مانند تست آگلوتیناسیون توصیه می گردد. در ایران آنتی سرمی که به عنوان کنترل مثبت در کیت های تشخیصی ویدال بکار می رود به صورت پلی والان بوده و بر علیه هر دو آنتی ژن O و H واکنش می دهد. هدف از این تحقیق تولید آنتی سرم اختصاصی (Mono specific) بر علیه آنتی ژن های O و H برای استفاده در کیت های مختلف از قبیل آگلوتیناسیون و غیره می باشد.

روش کار: سوسپانسیون باکتری غیرفعال شدهٔ dH و DO (استاندارد ۳ مک فارلند)، به صورت داخل وریدی به خرگوش سفید نیوزلندی تزریق گردید. یک هفته بعد از آخرین تزریق، خونگیری و جمع آوری سرم انجام پذیرفت. تست جذب، انکوباسیون با آنتی ژن H و O در ۳۷ درجهٔ سانتی گراد به مدت دو ساعت انجام شد و پس از سانتریفوژ، مایع رویی که حاوی آنتی سرم اختصاصی (Mono specific) بر علیه آنتی ژن های O و H بود جمع آوری گردید. همچنین جهت استفاده از این آنتی سرم های Mono specific، در تست های اختصاصی مانند الایزا، ایمونوفلئورسانس و غیره، تخلیص آنتی بادی با استفاده از روش های مختلف از قبیل رسوب با آمونیم سولفات، تانژنشیال فلوفیلتریشن و کروماتوگرافی انجام شد. مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.PII.REC.1399.006 در شورای پژوهشی انستیتو پاستور ایران تصویب شده است.

یافته‌ها: یافته های حاصل از تست آگلوتیناسیون قبل و بعد از جذب، نشان دهنده واکنش متقاطع قبل از جذب و عدم واکنش متقاطع با آنتی ژن H و O بترتیب با آنتی سرم های مونواسپسیفیک بر علیه O و H بعد از جذب می باشد. نتایج حاصل نشانگر این است که آنتی سرم خالص سازی شده هم از لحاظ کمیت (غلظت بالا) و کیفیت (خلوص بالا) از درجهٔ مناسبی برخوردار می باشد.

نتیجه گیری: تشخیص سریع بیماری به وسیله آزمایش های مختلف مانند تستهای سرمی که دارای حساسیت، اختصاصیت و سرعت عمل بالا و هزینه کمتری هستند، توصیه میشود. بنابراین با استفاده از آنتی سرم های اختصاصی تولید شده در این تحقیق، برای غربالگری اولیهٔ عفونت های سالمونلا، می توان از آنها در تست های مبتنی بر آگلوتیناسیون که سریع، مقرون به صرفه و آسان می باشند استفاده نمود. همچنین با توجه به درجه خلوص بالای به دست آمده، این آنتی سرم ها در تستهای مختلف، از قبیل الایزا و ایمونوفلئورسانس کاربرد دارند.

مقدمه

سالمونلا باسیل گرم منفی است که متعلق به خانوادهٔ انتروباکتریاسه و از پاتوژن های درون سلولی می باشد (۱). این باکتری عامل یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی است (۲).

در بین این باکتریها، سالمونلا تیفی (Salmonella typhi) و سالمونلا پاراتیفی (Salmonella paratyphi) عامل ایجاد تب روده و سالمونلا کلراسوئیس (Salmonella choleraesuis) توانایی زیادی در انتشار به درون سیستم گردش خون دارد و عفونت خونی خطرناکی را ایجاد می کنند (۳, ۴). از عوامل بیماریزایی سالمونلا می توان به زنده ماندن و تکثیر آنها در درون ماکروفاژها اشاره نمود. از طرفی سیستم ترشحی نوع III که در غشای باکتری قرار دارد، مواد سمی باکتری را به درون سیتوزول سلول میزبان منتقل می نماید (۵).

Copyright © 2022 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

در ایران دومین عامل ایجادکننده اسهال در انسان پس از شیگلا، باکتری سالمونلا می باشد (۶). در مقابل، شیوع آن در محل پرورش حیوانات باعث از دست رفتن تولیدات دامی، مرگ و میر، افزایش ضررهای اقتصادی می باشد. جهت جلوگیری از انتشار می بایست بیماری خیلی سریع تشخیص داده شود. برای تشخیص این باکتریها از روش های کشت (۷)، Multiplex PCR (۸) یا Real-time PCR (۹)، الایزا و روش های آگلوتیناسیون استفاده می گردد. شناسایی عامل بیماریزا با استفاده از تست های سرمی که حساسیت، اختصاصی بودن، سرعت عمل بالا و قیمت کمتری دارد سفارش می شود. چندین نمونه در یک زمان قابل آزمایش بوده، آنتی سرم تولیدی ایجاد آلودگی نکرده و با روش های کشت باکتری قابل مقایسه است. آنتی سرم در تشخیص سریع عامل بیماری و غربالگری کلنی باکتری کاربرد دارد. با توجه به سهولت روش و قیمت پایین آن، تست های آگلوتیناسیون روی لام همیشه از مقبولیت زیادی برخوردار بوده است. این روش در مطالعات اپیدمیولوژی نیز کاربرد دارد. در ایران کیت های تشخیصی (بر اساس آگلوتیناسیون و به روش سریع) توسط انستیتو پاستور تولید می شود. آنتی سرم های کنترل های مثبت موجود در این کیت به صورت پلی والان (۱۰) و بر علیه آنتی ژن های O و H عمل می کند. هدف از انجام این مطالعه تهیه آنتی سرم اختصاصی (Mono Specific) بر علیه آنتی ژن O و H جهت استفاده در تست های آگلوتیناسیون و الایزا می باشد.

روش کار

مراحل کشت، درو، غیرفعال سازی، ایمنی زایی، تست آگلوتیناسیون، تعیین غلظت و درجه خلوص بر اساس دستورالعمل های کاری رایج بخش (SOPs= Standard Operating Procedures) انجام شد.

کشت سالمونلا: سویه های DO و dH سالمونلا از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. کشت ابتدا در لوله آزمایش درپوش دار حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت سالمونلا براث انجام شد. این محیط کشت حاوی عصاره گوشت، عصاره مخمر و کازئین (شرکت HIMEDIA)، پپتون (شرکت OXOID)، سدیم کلراید، دی سدیم هیدروژن فسفات بدون آب و گلیسرول (تمام مواد از شرکت MERCK) می باشد. بعد از انکوباسیون در 37°c به مدت ۲۴ ساعت و اطمینان از رشد باکتری، ساب کالچر به فلاسک حاوی ۱۵۰ میلی لیتر سالمونلا آگار صورت پذیرفت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°c انکوبه گردید.

درو (Harvesting): برای درو کردن سالمونلا از محیط کشت کازئین دار از تامپون ۷/۲ (حاوی پتاسیم دی هیدروژن فسفات و دی سدیم هیدروژن فسفات و کلرید سدیم، تمام مواد از شرکت MERCK، با pH:7.2) استفاده شد. پس از ۱۰ الی ۱۵ دقیقه و تکان (shaking) دادن در بطری استریل جمع آوری گردید.

غیرفعال سازی (Inactivation) سویه ها: جهت غیرفعال سازی تودهٔ زیستی dH از فرمالدئید و به منظور غیرفعال کردن DO، از فنل (شرکت MERCK) و سپس حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ساعت استفاده شد. برای کنترل غیرفعال سازی، مقداری از تودهٔ زیستی بر روی محیط، کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. در صورت عدم رشد، باکتری غیر فعال شده تلقی می گردد.

پس از غیرفعال سازی، تودهٔ زیستی سانتریفوژ شده (۴۰۰۰ دور بر دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۳۰ دقیقه) و جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

ایمنی زایی خرگوش: ایمنی زایی هر سه روز یک بار طی ۵ مرحله تزریق به خرگوش به مقدار ۰/۵ سی سی و به صورت داخل عروقی در ورید کناری گوش صورت گرفت. یک هفته پس از آخرین تزریق، خونگیری (۵ مرحله به فاصله ی هر چهار روز یکبار) انجام و در لوله های فالکون ۵۰ سی سی جمع آوری گردید. لوله ها را دو بار به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی گراد و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سرم به لوله های فالکون تمیز انتقال داده شد.

تست آگلوتیناسیون: بر روی یک اسلاید شیشه ای، ۳۰ میکرولیتر از آنتی سرم جدا سازی را با ۳۰ میکرولیتر از آنتی ژن های DO، dH مخلوط کرده و بعد از یک دقیقه نتیجهٔ آگلوتیناسیون قرائت شد.

روش جذب: در این تست یک آنتی سرم بر علیه باکتری که به صورت پلی والان است (poly specific) است باید به حالت اختصاصی (mono specific) در بیاید.

در تست جذب، باکتری dH مانند مرحلهٔ قبل کشت داده و غیر فعالسازی گردید. سپس تودهٔ زیستی تهیه شده را با آنتی سرم تولیدی، مخلوط کرده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای ۴ درجهٔ سانتی گراد و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب بدست آمده حاوی کمپلکس آنتی ژن dH و آنتی بادی اختصاصی بر علیه آن بوده در حالی که محلول رویی آنتی بادی اختصاصی بر علیه DO می باشد. برای دستیابی به آنتی بادی مونواسپسیفیک بر علیه dH، در تست جذب باکتری DO کشت و غیر فعالسازی گردید. سپس تودهٔ زیستی تهیه شده را با آنتی سرم بدست آمده، مخلوط کرده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و همانند شرایط فوق سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل حاوی کمپلکس آنتی ژن DO و آنتی بادی اختصاصی بر علیه آن بوده در حالی که محلول رویی آنتی بادی اختصاصی بر علیه dH می باشد (۱۱).

خالص سازی آنتی سرم: تخلیص آنتی سرم بر علیه هر سوش بر اساس روش های کروماتوگرافی و غیرکروماتوگرافی انجام گرفت (۱۲).

رسوب سازی با آمونیوم سولفات: حجم مساوی از سرم با Nacl در یک بشر مخلوط و سپس به آن حجم مساوی از آمونیوم سولفات اشباع (شرکت MERCK) بصورت قطره قطره اضافه گردید. پس از انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه، محلول سانتریفوژ شده (۱۵۰۰ دور بر دقیقه، به مدت نیم ساعت) و رسوب با آمونیوم سولفات نیمه اشباع شستشو داده شد و مجدداً با شرایط فوق سانتریفوژ گردید و سپس رسوب در سدیم کلراید حل شد.

دیالیز با استفاده از دستگاه TFF (Tangential Flow Filtration):

پس از بهداشتی سازی دستگاه با استفاده از هیدروکسید سدیم (شرکت MERCK) ۰/۵ مولار، دیالیز بر علیه PBS، شرکت MERCK (با pH= ۷/۴) و با استفاده از فیلتر ۳۰ کیلو دالتونی (Merck, Pellicon® XL50) انجام شد. برای تایید حذف آمونیوم سولفات، تست نسلر (Nessler) (معرف نسلر + هیدروکسید پتاسیم (شرکت SIGMA ۲۰٪) انجام گردید.

تخلیص با استفاده از دستگاه TFF: در این مرحله خالص سازی با استفاده از دستگاه TFF (شرکت MILLIPORE) و فیلتر ۱۰۰ کیلو

دالتونی (Merck, Pellicon® XL50) و محلول PBS (با pH= ۷/۴) انجام شد.

کروماتوگرافی تعویض یونی: از محیط کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سفارز فست فلو DEAE Sephorose FF (شرکت AMERSHAM BIOSCIENCES) استفاده گردید. پس از بهداشتی سازی ستون با استفاده از NaOH (۰/۵ مولار)، متعادل سازی ژل (Equilibration) با استفاده از بافر فسفات (مخلوطی از بافر های سدیم دی هیدروژن فسفات دو آبه و دی سدیم هیدروژن فسفات دو آبه) انجام شد. پس از اعمال نمونه به ستون، خارج سازی (Elution) پروتئین از ستون به کمک بافر فوق انجام گردید. در انتها ستون با استفاده از سدیم کلراید بازیابی (Regeneration) شد.

تخلیص نهایی با استفاده از دستگاه TFF: به منظور خالص سازی بیشتر، پروتئین حاصل از مرحله قبل (کروماتوگرافی تعویض یونی)، مجددا در مقابل بافر فسفات از فیلتر ۱۰۰ کیلو دالتون عبور داده شد.

تعیین غلظت پروتئین: پس از خالص سازی آنتی سرم، غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Thermo Scientific™ GENESYS™ 30 visible و قرائت جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و همچنین روش برادفورد اندازه گیری شد.

تعیین درجهٔ خلوص آنتی بادی خالص شده: بعد از خالص سازی آنتی سرم مونواسپسیفیک، درجهٔ خلوص آن با استفاده از روش الکتروفورز Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis=SDS-PAGE) و ژل 12% بررسی گردید. در این روش آنتی سرم در بافر loading رقیق و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. ۲۰ میکرولیتر نمونه و ۴ میکرولیتر از نشانگر پروتئینی رنگ شده (Sinaclon) با محدوده وزن مولکولی ۱۰ تا ۱۸۰ کیلودالتون به چاهک مربوطه اعمال گردید. الکتروفورز به مدت ۲ ساعت در ولتاژ ۸۰ انجام شد. ژل با کوماسی بریلیانت بلو رنگ آمیزی و در اسیداستیک 0.04% رنگبری گردید.

ملاحظات اخلاقی: مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.PII.REC.1399.006 در شورای پژوهشی انستیتو پاستور ایران تصویب شده است.

یافته ها

خونگیری و جمع آوری سرم: حجم نهایی خون گرفته شده از خرگوش ها ۲۰۷ میلی لیتر و حجم سرم جمع آوری شده مطابق ۱۰۲ میلی لیتر بود.

نتایج آگلوتیناسیون قبل از جذب: تست آگلوتیناسیون بر روی سرم های بدست آمده قبل از انجام عمل جذب صورت پذیرفت. بر روی اسلاید شیشه ای، ۳۰ میکرولیتر از آنتی سرم بدست آمده بر علیه DO (شکل ۱-الف) و بر علیه dH (شکل ۱-ب) قرار داده و ۳۰ میکرولیتر از آنتی ژن های O و H اضافه نموده و مخلوط گردید. پس از گذشت یک دقیقه آن را بر روی لامپ پر نور قرار داده و مورد بررسی قرار گرفت که آگلوتیناسیون با هر دو آنتی ژن قابل رویت بود (شکل ۱).

تست جذب: مقدار ۱/۵ میلی لیتر از تودهٔ زیستی سالمونلا dH با جذب نوری ۰/۱ را با ۷ میلی لیتر از آنتی سرم پلی والان تولیدی، مخلوط گردید. پس از انکوباسیون (۳۷ درجهٔ سانتی گراد، ۲ ساعت) و سانتریفیوژ، مایع رویی که حاوی آنتی بادی اختصاصی بر علیه آنتی ژن O سالمونلا می باشد، جمع آوری شد. حجم آنتی سرم اختصاصی بعد از تست جذب ۷/۱ میلی لیتر بود.

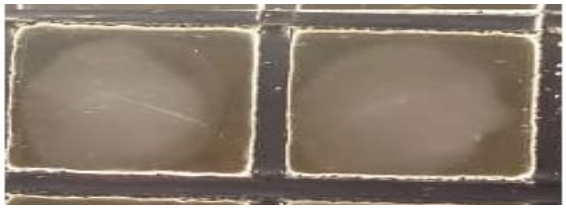
مقدار ۲ میلی لیتر از تودهٔ زیستی سالمونلا DO با جذب نوری ۱/۹۵ را با ۷ میلی لیتر از آنتی سرم پلی والان تولیدی، مخلوط گردید. پس از انکوباسیون (۳۷ درجهٔ سانتی گراد، ۲ ساعت) و سانتریفیوژ، مایع رویی که حاوی آنتی بادی اختصاصی بر علیه آنتی ژن H سالمونلا می باشد، جمع آوری شد. حجم آنتی سرم اختصاصی بعد از تست جذب ۸/۵ میلی لیتر بود.

تست آگلوتیناسیون بعد از جذب: بر روی اسلاید شیشه ای، ۳۰ میکرولیتر از آنتی سرم های بدست آمده بعد از مرحلهٔ جذب بر علیه DO (شکل ۲-الف) و بر علیه dH (شکل ۲-ب) قرار داده و ۳۰ میکرولیتر از آنتی ژن های O و H اضافه نموده و مخلوط گردید. نتایج نشان داد که آگلوتیناسیون فقط با آنتی ژن O به طور اختصاصی مشاهده گردید (شکل ۲).

نتایج آزمون نسلر: برای اطمینان از حذف یونهای آمونیوم سولفات و خلوص آنتی سرم های تهیه شده بر علیه DO (شکل ۳-الف) و بر علیه dH (شکل ۳-ب) در طی مرحله دیالیز، آزمون نسلر در چندین مرتبه انجام شد. در ابتدا، محلول به دست آمده به رنگ نارنجی بوده که نشان دهنده ناخالصی آنتی سرم (باقیماندهٔ آمونیم سولفات) بود. ولی در انتهای دیالیز، محلول به رنگ سفید قابل مشاهده بود که نشان دهندهٔ حذف آمونیم سولفات می باشد (شکل ۳).

غلظت آنتی بادی خالص سازی شده: مقدار پروتئین بعد از هر مرحله از خالص سازی، با استفاده از دستگاه نانودراپ ترمو (قرائت جذب نوری یا O.D) و روش برادفورد اندازه گیری شد (جدول ۱).

تعیین درجهٔ خلوص آنتی سرم: برای بررسی درجهٔ خلوص آنتی سرم های اختصاصی تهیه شده بر علیه DO (شکل ۴-الف) و بر علیه dH (شکل ۴-ب) بعد از تخلیص، از روش SDS-PAGE استفاده گردید. در این روش از ژل های ۱۲ درصد (Resolving) و ۴ درصد (Stacking) استفاده گردید. ۱۵ میکروگرم از پروتئین (بافر نمونه فاقد احیاء کننده) در هر چاهک از ژل اعمال گردید و الکتروفورز در ولتاژ ۶۵ و ۱۰۰ ولت انجام شد نتایج حاصل، درجهٔ خلوص بالای آنتی بادی را نشان می دهد شکل(۴).

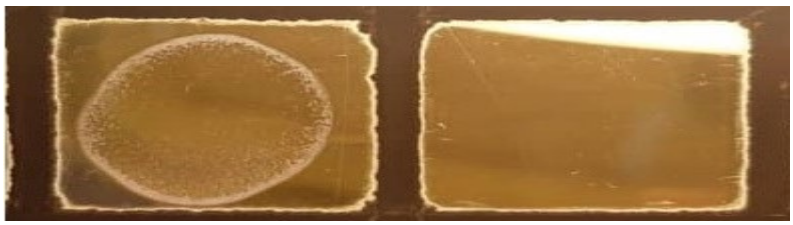


	آنتی ژن DO	آنتی ژن dH
آنتی سرم بر علیه DO	+	+

شکل (۱-الف). آگلوتیناسیون با آنتی سرم اولیه بر علیه DO بر روی اسلاید شیشه ای قبل از جذب

	آنتی ژن DO	آنتی ژن dH
آنتی سرم بر علیه dH	+	+

شکل (۱-ب). آگلوتیناسیون با آنتی سرم اولیه بر علیه dH بر روی اسلاید شیشه ای قبل از جذب

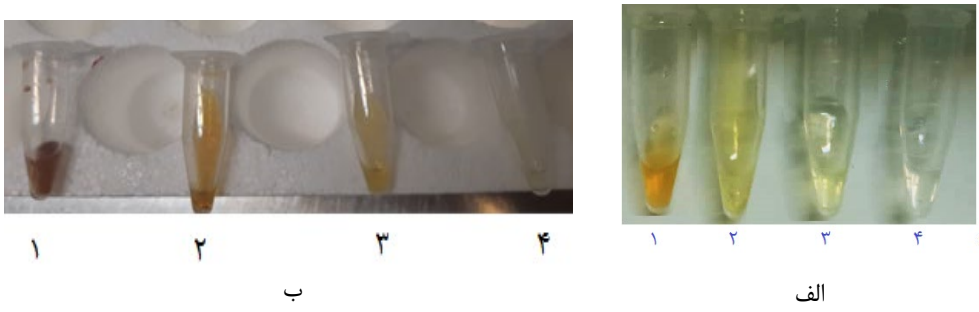


آنتی ژن	dH	DO
آنتی سرم بر علیه DO	_	+

شکل (۲-الف). آگلوتیناسیون با آنتی سرم اولیه علیه DO بر روی اسلاید شیشه ای بعد از جذب

آنتی ژن	dH	DO
آنتی سرم بر علیه dH	+	

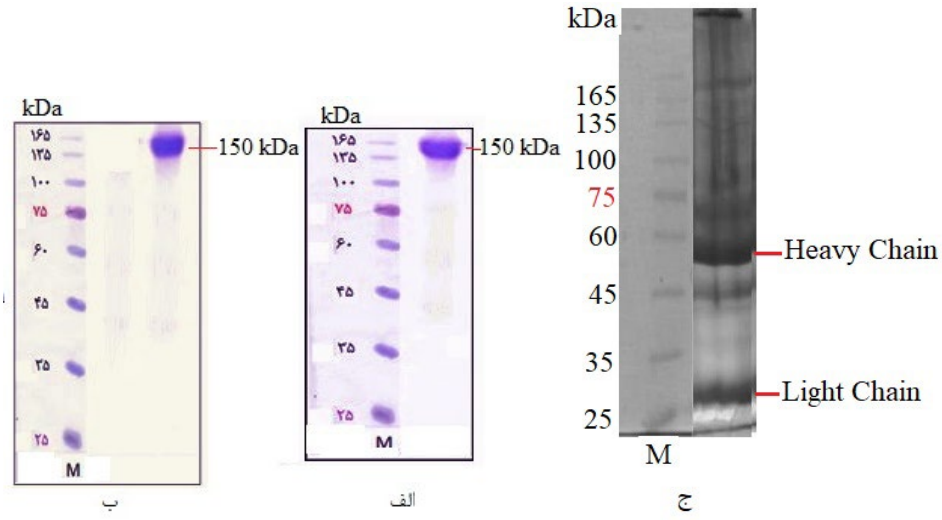
شکل (۲-ب). آگلوتیناسیون با آنتی سرم اولیه علیه dH بر روی اسلاید شیشه ای بعد از جذب



شکل ۳. آزمون نسلر. الف: آنتی سرم بر علیه DO). ب: آنتی سرم بر علیه dH. در ابتدا، محلول به دست آمده به رنگ نارنجی بوده که نشان دهنده ناخالصی آنتی سرم (باقیماندهٔ آمونیم سولفات) بود (۱). ولی در انتهای دیالیز، محلول به رنگ سفید قابل مشاهده بود که نشان دهندهٔ حذف آمونیم سولفات می باشد (۴).

جدول ۱. غلظت پروتئین (آنتی سرم) در مراحل مختلف تخلیص (روش برادفورد و جذب نوری)

ردیف	مرحله	آنتی سرم بر علیه DO		آنتی سرم بر علیه dH	
		برادفورد (mg/ml)	O. D	برادفورد (mg/ml)	O. D
۱	بعداز رسوب سازی با آمونیم سولفات	۱۱/۱۳	۱۲/۱۳	۱۲/۹۷	۱۴/۰۷
۲	بعد از فیلتر 30	۸/۸	۹/۴۲	۱/۸۱	۲/۴۱
۳	بعد از فیلتر 100	۶/۵۴	۷/۳۱	۳/۱۱	۳/۶
۴	بعد از IEX	۷/۶۹	۸/۲۶	۱/۲۹	۱/۶۶
۵	بعد از خالص سازی نهایی	۶/۵۹	۷/۶۱	۶/۸۶	۷/۶۹



شکل ۴. درجهٔ خلوص آنتی سرم اختصاصی. الف: بر علیه DO. **ب:** بر علیه dH. با استفاده از SDS-PAGE. باند ۱۵۰ کیلودالتونی مربوط به IgG می باشد. ج: تصویری از مراحل قبل از تخلیص، بعد از رسوب سازی. زنجیره های سنگین و سبک ایجاد شده به علت استفاده از ماده احیاء کننده در بافر اعمال نمونه می باشد.

M : مارکر سیناکلون با محدوده ۱۰ تا ۱۸۰ کیلو دالتون.

بحث

سالمونلا یکی از مهترین عوامل ایجاد کننده مسمومیت های غذایی در انسان است (۱۳). باتوجه به شیوع عفونت های سالمونلایی در دهه های اخیر، دانشمندان نسبت به احتمال وقوع همه گیری های جهانی آن بیمناک شده اند. به همین دلیل محققین به دنبال ابداع روش هایی برای شناسایی سریع و به موقع سالمونلا در مواد غذایی هستند.

در مطالعات مختلف روش های متفاوتی برای تشخیص سالمونلا مورد استفاده قرار گرفته است که از جمله این ها می توان به روش ها مبتنی برکشت و بررسی های بیوشیمیایی اشاره کرد (۱۴). روش های کشت میکروبی و بررسی های بیوشیمیایی بسیار وقت گیر بوده و برای بررسی تعداد زیاد نمونه ها چندان مطلوب نیستند. استفاده از روش الایزا برای ردیابی سالمونلا در مواد غذایی کارایی گسترده ای یافته است و حساسیت و ویژگی مناسبی را ارائه می نماید (۱۵). بنابراین شناسایی عامل بیماریزا با استفاده از تست های سرمی که حساسیت، اختصاصی بودن، سرعت عمل بالا و قیمت کمتری دارد سفارش می شود. چندین نمونه در یک زمان قابل آزمایش بوده، آنتی سرم تولیدی ایجاد آلودگی نکرده و با روش های کشت باکتری قابل مقایسه است. آنتی سرم در تشخیص سریع عامل بیماری و غربالگری کلنی باکتری کاربرد دارد. با توجه به تولید کیت های تشخیصی در کشور بر اساس آگلوتیناسیون (کیت ویدال) و استفاده از آنتی سرم پلی والان بر علیه آنتی ژن های O و H، هدف از انجام این تحقیق تهیه آنتی سرم اختصاصی فقط بر علیه آنتی ژن O یا H جهت استفاده در تست های آگلوتیناسیون و الایزا بود.

در ایـن تحقیق، برای تهیهٔ آنتـی سرم بر علیه آنتی ژن O و H، ایمنی زایی خرگوش از طـریق تزریق داخـل وریدی (ورید کناری گوش) انجام شد. تست آگلوتیناسیون بر روی اسلاید شیشه ای با استفاده از آنتی سرم های تولیدی با آنتی ژن های O و H انجام و نتایج مثبت (آگلوتیناسیون) با هر دو آنتی ژن مشاهده گردید که نشان دهندهٔ واکنش متقاطع می باشد (شکل ۱).

نیاکان و همکاران در سال۱۳۸۲، در تحقیقی به تهیه آنتی سرم تشخیص بر علیه سالمونلاهای گروه D و کاربرد آن جهت شناسایی سروتیپ های این گروه پرداختند. هدف از این تحقیق ارزیابی آنتی ژنهای باکتری سالمونلای گروه D می باشد که می توانند سیستم ایمنی را تحریک نموده و بطور اختصاصی آنتی سرم بر علیه این گروه تولید نمایند. آنتی ژن حرارت دیده موجب ایجاد سرم هیپرایمیون گردید. آنتی سرم بطور اختصاصی با نمونه های انسانی و حیوانی واکنش داده است (۱۶). مطالعهٔ حاضر نیز از لحاظ تولید آنتی سرم پلی کلونال بر علیه آنتی ژن O و H با تحقیق فوق قابل مقایسه می باشد با این تفاوت که آنتی سرم تولیدی پس از مراحل جذب اختصاصی بوده و فاقد هیچگونه واکنش متقاطع با دیگر آنتی ژن ها می باشد.

Carlson و همکاران در سال ۱۹۷۲، باکتری کشته شدهٔ سالمونلا را به خرگوش تزریق نمودند. ۱۴ روز پس از خونگیری و مخلوط کردن سرم ها، جذب با باکتری های سالمونلا از سوش های نامتجانس یا غیرمشابه که به وسیلهٔ حرارت غیرفعال شده بودند جهت دستیابی به آنتی سرم اختصاصی انجام پذیرفت. قبل از استفاده در تست هماآگلوتیناسیون، سرم ها غیرفعال گشته (۵۶ درجه سانتیگراد بمدت نیم ساعت) و دو بار با گلبول های قرمز شسته شدهٔ گوسفند، جذب انجام گرفت (۱۷). پژوهش حاضر نیز کاملاً با این مطالعه همپوشانی داشته و پس از تولید آنتی سرم بر علیه آنتی ژن O و H، تست جذب اختصاصی برای مونواسپسیفیک کردن آن صورت گرفته و با آنتی ژن متقابل مجاور و آنتی بادی های متقاطع حذف گردیدند.

برای بدست آوردن آنتی بادی اختصاصی بر علیه آنتی ژن O و H، تست جذب اختصاصی صورت گرفت. تست آگلوتیناسیون بر روی اسلاید شیشه ای با استفاده از آنتی سرم ها بعد از جذب با آنتی ژن های O و H انجام و نتایج مثبت (آگلوتیناسیون) فقط با آنتی ژن مربوطه مشاهده گردید که نشان دهندهٔ عدم وجود واکنش متقاطع می

باشد (شکل۲). آنتی سرم اختصاصی تهیه شده را می توان به عنوان کنترل مثبت همراه با آنتی ژن های موجود در کیت ویدال استفاده نمود.

علاوه بر این به منظور استفاده از آنتی سرم اختصاصی بر علیه آنتی ژن O و H در کیت های اختصاصی مانند الایزا، ایمونوفلئورسانس، وسترن بلات و غیره، مراحل خالص سازی نیز انجام پذیرفت.

پورامیر و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه ای به تهیه و تخلیص آنتی بادی پلی کلونال بر علیه آنتی ایمونوگلوبولین Y از خرگوش پرداختند. ایشان از روش رسوب با آمونیم سولفات استفاده نموده و رسوب را در بافر TBS حاوی کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار حل نمودند (۱۸). همچنین نظریان و همکاران در سال ۲۰۱۴ برای تخلیص آنتی بادی پلی کلونال بر علیه تتانوتوکسین از ستون G استفاده نمودند (۱۹). در تحقیق حاضر نیز از آمونیم سولفات به صورت اشباع (۵۰٪) استفاده و انکوباسیون با آن به مدت نیم ساعت انجام گرفت و رسوب در کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار حل گردید. همچنین ایشان از کیسهٔ دیالیز برای حذف آمونیم سولفات استفاده نموده اند که در مدت زمان یک شبانه روز این عملیات انجام گرفت. در حالیکه در مطالعه حاضر، از دستگاه TFF با فیلتر ۳۰ کیلو دالتونی برای این منظور استفاده گردید که مزایای فراوانی نسبت به کیسهٔ دیالیز را داراست. با این دستگاه می توان پروتئین های با حجم زیاد را در مدت زمان ۳-۴ ساعت دیالیز نمود که نسبت به کیسه دیالیز که وقت گیر بوده و احتیاج به یک شبانه روز دارد، دارای مزیت است. همچنین با استفاده از فیلترهای مختلف با محدوده های (Cut-off) وزن مولکولی متفاوت در این دستگاه که اجازهٔ حذف بسیاری از ناخالصی های با وزن مولکولی کمتر از این محدوده را می دهد می توان به درجهٔ خلوص بالاتری دست یافت.

علاوه بر این، در مطالعهٔ حاضر از فیلتر ۱۰۰ کیلودالتونی نیز استفاده گردید که باعث حذف ناخالصی هایی همچون آلبومین می گردد. از دیگر مزایای استفاده از دستگاه TFF، تغلیظ پروتئین می باشد. در صورت تخلیص حجم زیاد آنتی بادی، در مراحل مختلف تخلیص، حجم آن نیز افزایش پیدا می کند که با استفاده از این دستگاه در نهایت می توان پروتئین را پس از خالص سازی نیز تغلیظ نمود.

استفاده از دستگاه TFF، با فیلترهای مختلف، روشی نوین بوده که منجر به تهیهٔ آنتی بادی با درجه خلوص بالاتر در مدت زمان کمتری می گردد. همچنین برای حذف بعضی از ناخالصی ها و دستیابی به درجهٔ خلوص بالاتر، از روش کروماتوگرافی تعویض یونی (DEAE Sepharose FF) نیز استفاده گردید.

آنتی بادی خالص سازی شده از لحاظ کمیت (با استفاده از روش های جذب نوری و برادفورد) و کیفیت (با استفاده از روش SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داد که غلظت و درجهٔ خلوص آنتی بادی از درجهٔ بالایی برخوردار بوده (شکل۴) و می توان در کیت های اختصاصی جهت سنجش سالمونلا، مانند الایزا، ایمونوفلئورسانس و غیره از آن استفاده نمود.

نتیجه گیری

بر طبق نتایج آزمایشات کیفی و کمی (غلظت پروتئین، 6.59 mg/mL و 6.86 mg/mL بترتیب در مورد DO و dH)، آنتی سرم های بدست آمده پلی کلونال اختصاصی بر علیه آنتی ژن های O و H سالمونلا خالص و فاقد واکنش متقاطع بر علیه یکدیگر بودند. آنتی سرم های تولیدی، علاوه بر استفاده در روش های آگلوتیناسیون که زمان تشخیص را تسریع می بخشد و می تواند به عنوان سرم کنترل مثبت اختصاصی در کیت های تولیدی استفاده گردد و باعث بهبود کیفیت این کیت ها و حذف واکنش متقاطع شود، در مطالعات اپیدمیولوژی نیز کاربرد دارد. همچنین با توجه به درجهٔ خلوص بالا، می توان در کیت های اختصاصی مانند الایزا و ایمونوفلئورسانس استفاده نمود.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.PII.REC.1399.006 در شورای پژوهشی انستیتو پاستور ایران تصویب شده است.

حامی مالی

این مقاله از پایان نامه های دانشجویان کارشناسی ارشد خانم ها مهناز قهرمانی و رضوانه سادات فاطمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه دانش البرز استخراج گردیده است.

سهم نویسندگان

مفهو م سازی، روش پژوهش: مهناز قهرمانی و رضوانه سادات فاطمی؛ مشاوره: مهدی بنی طالبی؛ مشاوره و بازبینی: مهدی پریان؛ نگارش متن و بازبینی : رحمان شکری.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور بعمل آوردند.

References

1. Jantsch J, Chikkaballi D, Hensel M. Cellular aspects of immunity to intracellular Salmonella enterica. *Immunol Rev.* 2011;**240**(1):185-195. **doi:** 10.1111/j.1600-065X.2010.00981.x **pmid:** 21349094
2. Su LH, Chiu CH. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J.* 2007;**30**(3):210-219.
3. van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev.* 2000;**13**(1):144-166, table of contents. **doi:** 10.1128/CMR.13.1.144 **pmid:** 10627495
4. Nietfeld J, Tyler D, Harrison L, Cole J, Latimer K, Crowell W. Invasion of enterocytes in cultured porcine small intestinal mucosal explants by Salmonella choleraesuis. *Am J Vet Res.* 1992;**53**(9):1493-1499.
5. Brumell JH, Marcus SL, Finlay BB. N-terminal conservation of putative type III secreted effectors of Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol.* 2000;**36**(3):773-774. **doi:** 10.1046/j.1365-2958.2000.01878.x **pmid:** 10844665
6. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006;**7**:33. **doi:** 10.1186/1471-2199-7-33 **pmid:** 17026756
7. Clark MA, Barrett EL. The phs gene and hydrogen sulfide production by Salmonella typhimurium. *J Bacteriol.* 1987;**169**(6):2391-2397. **doi:** 10.1128/jb.169.6.2391-2397.1987 **pmid:** 3108233
8. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical

samples. *J Clin Microbiol*. 2004;**42**(4):1734-1738. **doi:** 10.1128/JCM.42.4.1734-1738.2004 **pmid:** 15071035
9. Hoorfar J, Ahrens P, Radstrom P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of Salmonella enterica. *J Clin Microbiol*. 2000;**38**(9):3429-3435. **doi:** 10.1128/JCM.38.9.3429-3435.2000 **pmid:** 10970396
10. Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J*. 2005;**46**(3):269-279. **doi:** 10.1093/ilar.46.3.269 **pmid:** 15953834
11. Lichtenberg JY, Ling Y, Kim S. Non-Specific Adsorption Reduction Methods in Biosensing. *Sensors (Basel)*. 2019;**19**(11). **doi:** 10.3390/s19112488 **pmid:** 31159167
12. Panahi Z, Kia V, Moghiman M, Doroud D, Shokri R, Paryan M. A Fast and Straightforward Method for the Purification of Anti-Immunoglobulin G (IgG) for Coombs Wright Assay. *JoMMID*. 2020;**8**(4):155-160. **doi:** 10.29252/JoMMID.8.4.155
13. Dos Santos AMP, Ferrari RG, Conte-Junior CA. Virulence Factors in Salmonella Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Curr Microbiol*. 2019;**76**(6):762-773. **doi:** 10.1007/s00284-018-1510-4 **pmid:** 29785632
14. Kaur A, Kapil A, Elangovan R, Jha S, Kalyanasundaram D. Highly-sensitive detection of Salmonella typhi in clinical blood samples by magnetic nanoparticle-based enrichment and in-situ measurement of isothermal amplification of nucleic acids. *PLoS One*. 2018;**13**(3):e0194817. **doi:** 10.1371/journal.pone.0194817 **pmid:** 29590194
15. Di Febo T, Schirone M, Visciano P. Development of a Capture ELISA for Rapid Detection of Salmonella enterica in Food Samples. *Food Anal Method*. 2019;**12**:322-330. **doi:** 10.1007/s12161-018-1363-2
16. Nyakan M. Preparation of diagnostic antiserum against group D Salmonella and its use to identify serotypes of this group Internet.2003.
17. Carlson VL, Snoeynbos GH. Relationship of population kinetics of Salmonella typhimurium and cultural methodology. *Am J Vet Res*. 1972;**33**(1):177-184.
18. Pour Amir M, Mahjoub S, Maliji G. Preparation and purification of anti immunoglobulin Y antibodies from rabbit. *JBUMS*. 2004;**6**(1):7-13.
19. Nazarian S, Olad G, Arefpour MA, Salimian J, Bagheripour MJ, Minaie ME. Polyclonal Antibody Production and Purification against Tetanospasmin. *J Police Med*. 2014;**3**(2):101-106.