مطالعه و طراحی روش تشخیص سریع ویبریو کلرا با ایجاد کمپلکس کوآگلوتیناسیون با استفاده از استافیلوکوکوس اورئوس واجد پروتئین A

شاهین حدادیان[1*]، پگاه آریافر[2]، اردشیر حسام پور[2]، مینا سپاهی[1]، سیده مرضیه حسینی[1]

۱) انستیتو پاستور ایران، بخش نانو تکنولوژی، تهران، ایران

۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵

چکیده

مقدمه: ویبریوکلرا باکتری بیماریزا گرم منفی است که عامل وبا بیماری اسهال کشنده است. وبا عمدتاً در ماه های گرم، وقتی باکتری بتواند در آب آلوده به مدفوع به سرعت تکثیر کند مشاهده می گردد. این بیماری یک نوع اسهال شدید است که در طی قرن ها به شدت وضعیت بهداشت و اقتصاد جوامع مبتلا را تحت تاثیر قرار می دهد. طراحی و ارائه یک روش سریع و قابل اعتماد برای شناسایی ویبریوکلرا به عنوان یک بیماری مسری و باکتری سریع شد و قابل انتقال یکی از چالش های این دهه می باشد.

مواد و روش ها: خرگوش های سفید نیوزیلندی با سلول کامل ویبریوکلرا اگاوا و اینابا ایمن شدند. گاماگلوبین های به دست آمده از سرم تام در مرحله اول توسط ترسیب سولفات آمونیوم تخلیص و تغلیظ گردید و سپس خلوصاین پادگن ها با به کارگیری کروماتوگرافی میلی ترکیبی در مرحله بعد افزایش یافت. .این آنتی بادی ها به سلول های کامل استافیلوکوکوس اورئوس cowan 1 NCTC-8325 متصل گردید. نمونه های سواب رکتال به یک محیط آب پپتونه قلیایی(pH 8.6) غنی شده تلقیح گردید و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. یک قطره از هر نمونه را با یک قطره از کمپلکس کوآگلوتیناسیون ویبریوکلرا مخلوط و نتایج در عرض ۳-۲ دقیقه گزارش گردید.

یافته های پژوهش: نتایج حاصل از اندازه گیری حساسیت، ویژگی و دقت آزمون طراحی شده در مقایسه با روش کشت استاندارد به ترتیب برابر ۹۷، ۹۹ و ۹۸ درصد حاصل گردید که به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد جهت به کارگیری در شیوع اندمیک یا همه گیر بیماری کشنده و قابل انتقال وبا روش کارآمدی به حساب می آید.

بحث و نتیجه گیری: روش کوآگلوتیناسیون طراحی شده در این پژوهش یک روش ساده، سریع و قابل اعتماد برای تشخیص ویبریوکلرا در نمونه مدفوع می باشد که می تواند در شناسایی سریع و کنترل موارد اسهال شدید حاصل از بیماری وبا به خصوص در زمان همه گیری در مناطق با امکانات آزمایشگاهی حداقل مورد استفاده قرار گیرد و مانع شیوع و مرگ و میر توسط این بیماری مسری گردد.

واژه های کلیدی: کمپلکس کواگلوتیناسیون، پروتئین A، استافیلوکوکوس اورئوس، ویبریوکلرا، کوآگلوتیناسیون

* نویسنده مسئول: انستیتو پاستور ایران، بخش نانو تکنولوژی، تهران، ایران

Email:hadadian@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]

مقدمه

ویبریوکلرا یا بیماری وبا سالانه ۳ تا ۵ میلیون نفر را در جهان آلوده می کند و باعث مرگ و میر ۱۰۰۰۰۰ تا ۱۲۰۰۰۰ نفر می گردد و به عنوان یک بیماری مسری خطرناک از سالیان دور تا امروز شناخته می شود(۱،۲). پژوهش ها نشان می دهد که در طی دو قرن گذشته این بیماری عامل اصلی مرگ و ایجاد عوارض چشمگیر در بسیاری از کشورهای در حال توسعه نقش داشته است .

این میکروارگانیسم دارای ۴ بیوتیپ el tor، cholera albenis و proteus است. بیوتیپ cholera و el tor به دلیل تولید سم سبب وبای کلاسیک می شوند وجزء سروگروپ O1 هستند. البته برخی از بیوتیپ های سروگروپ های O1 سم تولید نمی کنند و موجب بیماری ایجاد نمی گردند. بیوتیپ های albenis و proteus با پادتن اختصاصی آگلوتیناسیون ایجاد نمی کنند و معمولاً سویه های غیرآگلوتینه یا غیرکلرا نامیده می شوند(۵-۳). بیوتیپ ویبریوکلرا از نظر ساختار آنتی ژنی نیز به ۳ سروتیپ ogawa، inaba و hicojima تقسیم بندی می گردد. وبا بیماری مختص انسان بوده و تاکنون باعث ۷ عالم گیری شده که نتیجه آن هزاران مرگ و میر و آسیب های بزرگ اجتماعی و اقتصادی بوده است(۶).

در پژوهش انجام شده با تهیه یک کواگلوتیناسیون حاصل از اتصال پادگن اختصاصی ویبریوکلرا به پروتئین A باکتری استافیلوکوکوس، یک روش ساده، سریع و با دقت و حساسیت بالا طراحی و مورد آزمون قرار گرفته است. مزیت این روش علاوه بر سرعت، دقت و حساسیت بالا، سادگی انجام آزمون حتی مناطق دور افتاده و با حداقل فضا و تجهیزات آزمایشگاهی می باشد. اگر چه امروزه شمار زیادی از روش های میکروب شناسی از قبیل کشت، سروتایپینگ ریزاندامگان از طریق آگلوتیناسیون روش های زیست شیمیایی و زیست شناختی، سنجش سم، الایزا و ایمنوفلورسانس توسعه یافته که برای تشخیص ویبریوکلرای سم زا به کار می رود ولی اغلب پر هزینه و وقت‌گیر هستند(۷،۸). و هم چنین دارای محدودیت هایی مختلف از نظر زمانی، نتایج کاذب، عدم حساسیت به مقادیر کم بیماری هستند(۱۱-۹)

مواد و روش ها

تهیه پادگن /یمن شده: سویه استاندارد اگاوا (Ogava)، اینابا(Inaba) باکتری ویبریوکلرا O1 از بخش واکسن های باکتریایی تهیه و بر اساس پروتکل بخش مربوطه در محیط اختصاصی Brain heart infusion(Sigma-Aldrich) کشت داده شد و بعد از رشد جهت اطمینان از سویه مورد استفاده از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی، ریخت شناسی، آزمون اکسیداز و واکنش آگلوتیناسیون با آنتی سرم های اختصاصی وبا مورد بررسی قرار گرفتند. سویه های ogawa و inaba کشت داده شده در محیط کشت برین هارت اینفیوژن مایع پس از آن رشد و ایجاد مایع غلیظ میکروبی جمع آوری گردید.

تهیه آنتی ژن تزریقی: مایع غلیظ میکروبی جمع آوری شده ابتدا در سرم فیزیولوژی فنیکه(۰/۵ درصد) حل گردید و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت سپس دو بار با بافر فسفات نمکی(pH=7.2) شستشو داده و یک ساعت در بن ماری، ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت، پس از شستشوی مجدد، سوسپانسیونی حدود ۹×۱۰^{۸} سلول در میلی لیتر معادل لوله شماره III مک فارلند تهیه شد.

تهیه آنتی سرم: خرگوش ماده سفید نیوزلندی با وزن تقریبی ۲ کیلوگرم تهیه و بر اساس دستورالعمل تولید پادگن در خرگوش در بخش تولید پادگن های باکتریایی(۱۲) در روز اول و هفته سوم، پنجم، هفتم و نهم به ترتیب، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی لیتر از آنتی ژن تزریقی تهیه شده، از طریق رگ مارژینال گوش به خرگوش های انتخابی تزریق گردید سپس اولین، دومین و سومین خون گیری آن پس از ۷، ۱۵ روز و دو ماه استراحت پس از آخرین تزریق انجام گرفت و سپس خون گرفته شده به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید و در ادامه با دوبار سانتریفوژ در g ۳۵۰۰ هر بار ۳۰ دقیقه سرم آن جدا گردید. در نهایت سرم خرگوش هایی که تیتر بالای ۶۴۰ را از خود نشان دادند با یکدیگر مخلوط شد. برای جداسازی IgG، ابتدا سرم خرگوش را با سولفات

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]

آمونیوم ۵۰ درصد اشباع ترسیب نموده(۱۳،۱۴) و برای خلوص بیشترسرم در مرحله بعد از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی استفاده گردید. خلوص آنتی سرم حاصل گردیده با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پروتئین نیز با روش لوری اندازه گیری گردید.

سویه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس Staphylococcus aureus با کد شناسایی 8325 NCTC به صورت لیوفیلیزه از بانک میکروبی انستیتوپاستور ایران تهیه و کشت گردید و خصوصیات بیوشیمیایی شامل کاتالاز، کواگولاز اسالیدی و لوله ایی، مانیتول سالت آگار و Dnase جهت اطمینان از باکتری مورد استفاده مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه کمپلکس کوآگلوتیناسیون: حجم سلول استافیلوکوکوس اورئوس را به ۱۰ میلی لیتر رسانده و به آن ۰/۵ درصد فنل اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفته و سپس ۱ ساعت در شیکر بن ماری ۶۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و در یخچال نگه داری گردید. سپس سه بار توسط بافر فسفات نمکی(pH 7.2) شسته شده و در آخرین شستشو رسوب را در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات نمکی(pH 7.2) حل نموده و به منظور فیکس نمودن و حساس شدن باکتری ها ۰/۵ درصد فرم آلدئید ۳۷ درصد اضافه گردید. سپس ۵ دقیقه در شیکر بن ماری ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و بلافاصله سرد گردید. سوسپانسیون ۲ بار در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردیده و سپس به توده سلولی حاصل ۱۰ میلی لیتر، بافر فسفات نمکی(pH 7.2) حاوی ۱ به ۱۰۰۰۰ مرتیولات اضافه گردید. سپس به ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون توده سلولی حساس شده، ۰/۲ میلی لیتر آنتی سرم اینابا و ۰/۲ میلی لیتر آنتی سرم اگاوا که قبلا در ۵۶ درجه سانتی گراد، ۳۰ دقیقه حرارت دیده است اضافه گردید، (حرارت آنتی سرم ها باعث از بین رفتن کمپلمان ها می شود). این سوسپانسیون را ۳ ساعت در دمای آزمایشگاه بر روی شیکر نگه داری نموده و با ۵/۶ میلی لیتر، بافر فسفات نمکی(pH 7.2) حاوی ۱ به ۱۰۰۰۰ مرتیولات رقیق گردید، این سوسپانسیون به عنوان واکنش گر کوآگلوتیناسیون(کمپلکس کوآگلوتیناسیون) شناخته می شود.

بررسی اثر کمپلکس کوآگلوتیناسیون بر نمونه های حاوی ویبریوکلرا: روی شیشه تقسیم ابتدا یک قطره سرم فیزیولوژی برای کنترل منفی قرار داده گردید، هم چنین سوسپانسیون حاوی ویبریوکلرا inaba، و ogawa و هر دو سویه مجزا نیز قرار داده شد، سپس یک قطره از واکنشگر کوآگلوتیناسیون بر روی هر یک از آن ها اضافه گردید و برای ایجاد اگلوتیناسیون با اپلیکاتور استریل با هم مخلوط گردید و پس از گذشت ۵-۴ دقیقه آگلوتیناسیون ایجاد شده مورد مطالعه قرار گرفت. سپس نمونه های آزمایشگاهی را با روش کوآگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفت. به منظور مقایسه روش کلاسیک که به صورت روتین در آزمایشگاه ها و بیمارستان ها برای تشخیص ویبریوکلرا در مدفوع استفاده می گردد با این روش کوآگلوتیناسیون مورد سنجش قرار گرفت.

ملاک انتخاب نمونه: افرادی که از نظر بالینی مشکوک بوده و توسط پزشک به آزمایشگاه معرفی گردیده و ویبریوکلرا از نمونه آن ها گردیده است(۲۰ مورد) به عنوان شاهد مثبت و افرادی که جواب آزمون ویبریوکلرا آن ها منفی بود(۱۵مورد) به عنوان شاهد سالم انتخاب گردیدند.

بررسی نمونه ها به روش کوآگلوتیناسیون: به منظور رشد سریع ویبریوکلرای موجود در نمونه ها، سوآپ رکتال را در آب پپتونه قلیایی(pH 8.6) در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت قرار گرفت و برای بررسی به روش کوآگلوتیناسیون ابتدا روی شیشه تقسیم تمیز، یک قطره از کشت فوق را با یک قطره از کمپلکس کوآگلوتیناسیون قرار داده و با کمک اپلیکاتور مخلوط کرده وپس از ۴ تا ۵ دقیقه توسط چشم غیر مسلح مورد بررسی قرار گرفت و بررسی گردید.

یافته های پژوهش

نمونه های جمع آوری شده به وسیله کمپلکس کوآگلوتیناسیون تهیه شده بررسی شد. روش کوآگلوتیناسیون بر نمونه هایی که به وسیله روش کشت بیمار(مثبت) و شاهد سالم گزارش شدند، انجام شد. بررسی حساسیت و ویژگی روش کوآگلوتیناسیون،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]

با مقایسه روش کوآگلوتیناسیون بر مبنای انتخاب نمونه های بیمار و شاهد سالم به روش کشت(۱۰۰ درصد بیمار و ۱۰۰ درصد سالم) بوده است. از ۱۵ نمونه بیمار توسط کشت، ۱۴ مورد نیز توسط کمپلکس کوآگلوتیناسیون مثبت تلقی شد زیرا آگلوتیناسیون مشاهده گردید و از ۲۰ نمونه شاهد سالم به روش کشت، ۲۰ مورد منفی(سالم)، با روش کوآگلوتیناسیون ثبت شد زیرا در آن ها آگلوتیناسیون مشاهده نگردید. محاسبات آماری زیر حساسیت و ویژگی روش کوآگلوتیناسیون و مقایسه آن با روش کشت(کلاسیک)، در نمونه های مورد مطالعه، را نشان می دهد(جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱. مقایسه نتایج روش کوآگلوتیناسیون با کشت کلاسیک در تشخیص ویبریوکلرا

ردیف	محاسبه حساسیت و ویژگی روش های کلاسیک و کواگلوتیناسیون				
۱	نمونه مثبت مورد آزمون	نتایج مثبت به روش کشت	نتایج مثبت به روش کواگلوتیناسیون	حساسیت روش کشت	حساسیت روش کواگلوتیناسیون
۲	۱۵	۱۵	۱۴	15/15 = %100	14/15 = % 93
۴	نمونه منفی مورد آزمون	نتایج منفی به روش کشت	نتایج منفی به روش کواگلوتیناسیون	ویژگی روش کشت	ویژگی روش کواگلوتیناسیون
۵	۲۰	۲۰	۲۰	100%	100%

٪ ۹۳/۳ = ۱۴/۱۵×۱۰۰=حساسیت روش کوآگلوتیناسیون بر روش کشت

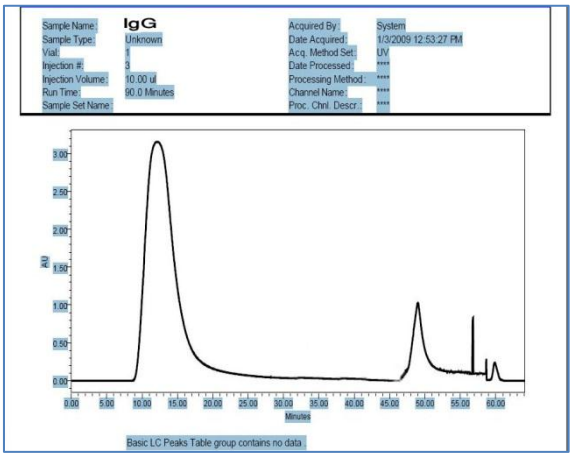
ردیف ۱ و ۲ بیانگر نسبت ارتباط تعداد موارد مثبت کوآگلوتیناسیون که به نحو صحیح با روش کشت نیز مثبت گزارش شده بود به تعداد کل موارد مثبت کشت را نشان می دهد، که نشان دهنده حساسیت روش است.

٪ ۱۰۰ = ۲۰/۲۰×۱۰۰ = ویژگی روش کوآگلوتیناسیون بر روش کشت

ردیف ۳ و ۴ بیانگر نسبت ارتباط تعداد موارد منفی کوآگلوتیناسیون که به نحو صحیح با روش کشت نیز منفی گزارش شده بود به تعداد کل موارد منفی کشت را نشان می دهد، که نشان دهنده ویژگی روش است

همان طور که محاسبات نشان می دهد، حساسیت روش کوآگلوتیناسیون ۹۳/۳ درصد، و ویژگی آن ۱۰۰ درصد گردید(۱۵). بنا بر این روش کوآگلوتیناسیون تقریباً معادل روش کشت کلاسیک از نمونه های مورد نظر است و روشی قابل اطمینان می باشد. هم چنین می توان نمونه ها را در مدت زمان کوتاه تری بررسی نمود، و نتایج حاصله سریع تر در دسترس می باشد، و از نظر اقتصادی کم هزینه تر می باشد.

پیک سمت چپ اولین پروتئین خروجی از ستون است که همان آنتی بادی مورد نظر ما می باشد و پیک بعدی پیک دیگر پروتئین های سرمی مانند آلبومین می باشد(شکل شماره ۱).

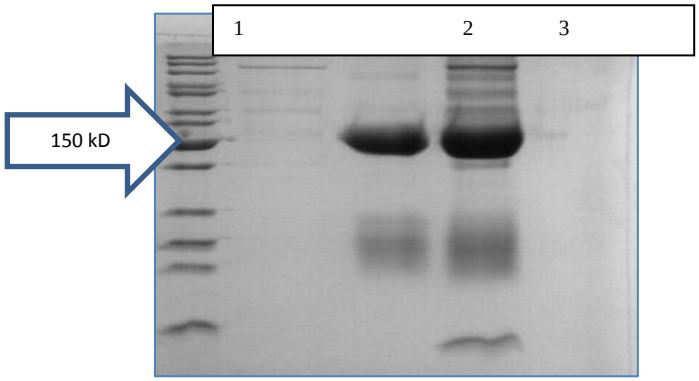


شکل شماره ۱. نمودار منحنی تخلیص آنتی بادی و آلبومین به روش affinity chromatography

بر اساس شکل شماره ۲ باندهای مشاهده شده بعد از انجام روش SDS-PAGE موجود در نمونه ها در محدوده ۱۵۰ کیلودالتون قرار گرفته که معادل محدوده وزن مولکولی ایمنوگلوبولین G است. وجود باندهای دیگر بعد از خال سازی به روش affinity chromatography به دلیل شکستن پادگن ها و ایجاد زنجیره سبک و سنگین است.

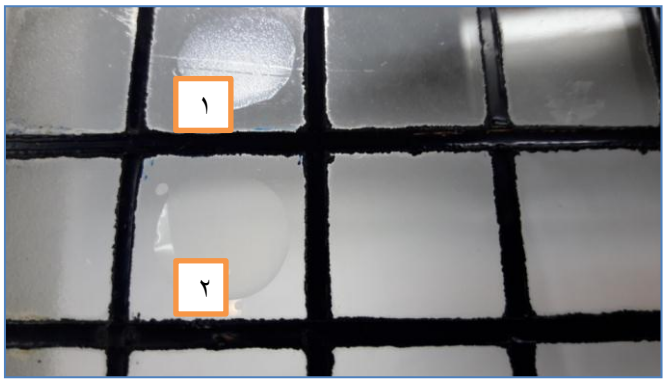
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]



شکل شماره ۲. روش SDS-PAGE برای مطالعه تخلیص IgG . شماره ۱ protein Ladder و شماره ۲ و ۳ آنتی بادی تخلیص شده به روش affinity chromatography

شکل شماره ۳ نشان دهنده اختصاصی بودن کواگلوتیناسیون تهیه شده برای شناسایی باکتری ویبریوکلرا می باشد و فقط در حضور باکتری فوق ایجاد اگلوتیناسیون ایجاد شده و قابل مشاهده است.



شکل شماره ۳ . اثر کوآگلوتیناسیون تهیه شده بر نمونه حاوی ویبریوکلرا. شماره ۱ تست منفی فاقد ویبریوکلرا و شماره ۲ تست مثبت حاوی باکتری ویبریوکلرا

بحث و نتیجه گیری

شناسایی سریع و به موقع ویبریوکلرا یا وبا اولین و مهم ترین مرحله در تشخیص به موقع این بیماری می باشد. نکته مهم در این بیماری این است که فقط گونه های دارای سم این باکتری قادر به ایجاد بیماری اسهال آبکی شدید، مرگ و اپیدمی می باشند که نیاز به تشخیص سریع می باشند(۱۶،۱۷). روش های متداول میکروبیولوژی که جهت شناسایی ویبریوکلرا به کار برده می شوند که شامل کشت باکتری و آزمون های بیوشیمیایی و ایمونولوژیک می باشند اغلب وقت گیر بوده و چند روز به طول می انجامد، این در حالی است که شناسایی سریع و دقیق اصل مهم در این بیماری کشنده می باشد لذا وجود یک روش سریع و آسان که در زمان کوتاه قادر به جوابگویی باشد و از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار باشد لازم و ضروری است(۲۱-۱۸).

روش کلاسیک و روتین نیاز به زمان طولانی برای تشخیص ویبریوکلرا دارد ولی این در حالی است که عدم شناسایی به موقع می تواند موجب مرگ و میر به ویژه در کودکان زیر ۶ سال شود لذا تشخیص سریع بیماری دارای ارزش بالایی است. روش های سریع دیگر برای تشخیص ویبریوکلرای موجود در مدفوع

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]

بیان شده است که می توان به روش قطره معلق که روشی ساده و سریع است اما ویژگی و حساسیت مناسبی ندارد اشاره کرد(۲۴-۲۲).

مطالعات انجام شده در سایر کشورها حاکی از افزایش روند مقاومت ویبریوکلرا به آنتی بیوتیک های رایج دارد هم چنین موارد زیادی از مقاومت ویبریوکلرای O1 نسبت نالیدیکسیک اسید، کوتریموکسازول وفورازولیدون گزارش شده است. مقاومت دارویی چندگانه در ویبریوکلرا مورد توجه زیادی می باشد(۲۵). در مطالعاتی که در خصوص ارائه تکنیک های شناسایی و تشخیص وبا انجام گرقته است روش معرفی شده توسط بنسون و همکاران(۲۶) با آن که از دقت و اختصاصیت بالایی برخوردار است ولی نیاز به میکروسکوپ زمینه تاریک دارد که در همه آزمایشگاه موجود نمی باشد. روش دیگر تکنیکی هست که توسط فرانک اشتاین و همکاران ارائه شده است(۲۷) ولی از معایب آن به کارگیری پادگن فلوئورسنت می باشد که این روش را گران و نیازمند تجهیزات خاص معرفی می نماید. اگر دیگر تکنیک های به ثبت رسیده مربوط به روش جوداسون و همکارن می باشد که به دلیل جواب های کاذب فراوان نمی تواند روش مناسبی باشد. تکنیک مناسب دیگر که توسط لسمانا و همکارن معرفی شده است(۲۸) اگر چه روش بسیار دقیق و اختصاصی می باشد ولی کل آزمون ۱۸ ساعت به طول می انجامد که برای بیماری سریع الانتقالی مانند وبا روش مناسبی نمی باشد. در روش ارائه شده در این پژوهش تلاش گردیده است که بسیاری از نواقص روش های قبلی که در بالا آمده است تحت پوشش قرار گیرد و تصحیح گردد. روش سریع کوآگلوتیناسیون جهت سروتایپ باکتری های بیماریزایی هم چون نایسریا گنوره ا، نایسریا منتژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنمونیه، اشرشیاکلی آنتروپاتوژن، کمپیلوباکتر، سالمونلا و بروسلا به صورت موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است(۲۹،۳۰).

و نتایج نشان می دهد که روش کوآگلوتیناسیون روشی حساس اختصاصی آسان سریع و کم هزینه برای تشخیص ویبریوکلرا می باشد که با امکانات کم قابل استفاده در آزمایشگاه ها است هم چنین روشی مناسب برای کنترل و تشخیص بیماری وبا می باشد. بنا بر این این روش با حساسیت و ویژگی بالایی که دارد و برتری نسبت به روش کشت کلاسیک می تواند جایگزین آزمایش های معمول در بیشتر مراکز درمانی شود.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه پرسنل محترم انستیتو پاستور ایران، مجتمع تولیدی تحقیقاتی کرج که امکانات و سویه های مورد نیاز را جهت انجام این تحقیق در اختیار ما قرار دادند، تشکر و قدردانی می گردد. هم چنین از جناب آقای دکتر حجت احمدی عضو هیئت علمی انستیتو پاستور ایران و جناب آقای نجاتی رییس بخش آنتی سرم های باکتریال که مشاور علمی و تکنیکی در این پروژه بودند، تشکر می گردد.

References

1.World Health Organization. Cholera 2006. Wkly Epidemiol Rec 2007; 82: 273-84.

2.Mandal S, Mandal MD, Pal NK. Cholera a great global concern. Asian Pacif J Trop Med2011;47:573-80. doi: 21803312. Epub 2011/08/02. eng.

3. Jabeen K, Zafar A, Hasan R. Increased isolation of Vibrio cholerae O1 serotype Inaba over serotype Ogawa in Pakistan. Eastern Mediter Health J 2008; 14: 564-70.

4.Shinoda S, Furumai Y, Katayama S, Mizuno T, Miyoshi S. Ecological study of pathogenic vibrios in aquatic environments. Biocontrol Sci2013;18:53-8.

5.Muanprasat C, Chatsudthipong V. Cholera pathophysiology and emerging therapeutic targets. Fut Med Chem2013; 7:781-98. doi:23651092. Epub 2013/05/09. eng.

6.Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Nair BG, Sack DA, Lucas M, Deen JL, et al. Cholera in Mozambique variant of Vibrio cholerae. Emerg Inf Dis2004;10:2057-9. doi:16010751. PMC3329043. Epub 2005/07/14. eng.

7.Nordstrom JL, Vickery MC, Blackstone GM, Murray SL, Depaola A. Development of a multiplex real time PCR assay with an

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]

internal amplification control for the detection of total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus bacteria in oysters. Appl Environ Microbiol 2007;73:5840-7.

8.Kumar BK, Raghunath P, Devegowda D, Deekshit VK, Venugopal MN, Karunasagar I, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in seafood. Int J Food Microbiol 2011;145:244-9.

9.Dick MH, Guillerm M, Moussy F, Chaignat CL. Review of two decades of cholera diagnostics how far have we really come? PLos Neg trop Dis2012;6:1845. doi:23071851. PMC3469466. Epub 2012/10/17. eng.

10.Ramamurthy T, Pal A, Bag PK, Bhattacharya SK, Nair GB, Kurozano H, et al. Detection of cholera toxin gene in stool specimens by polymerase chain reaction: comparison with bead enzyme-linked immunosorbent assay and culture method for laboratory diagnosis of cholera. J Clin Microbiol1993;11: 068-70. doi: 8263204. PMC266223. Epub 1993/11/01. eng.

11.Shlyapnikov YM, Shlyapnikova EA, Simonova MA, Shepelyakovskaya AO, Brovko FA, Komaleva RL, et al. Rapid simultaneous ultrasensitive immunodetection of five bacterial toxins. Anal Chem 2012;84:3۵۵۹--63.

12.Akerstrom B, Brodin T, Reis K, Bjorck L. Protein G a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. J Immunol1985;135:2589-92.

13.Wingfield P. Protein precipitation using ammonium sulfate. Curr Prot Pro Sci1998;13:1-8.

14.Wingfield PT. Protein precipitation using ammonium sulfate. Curr Prot Pro Sci2016;84:31-9.

15.Safari S, Bratlou A. Evidence-based medicine. Iranian Emerge Med J2015;2:147-9.

16.Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, Chakraborty S, Basu A, Bhattacharya SK, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic Vibrio cholerae O1 and O139. FEMS Immunol Med Microbiol1998;20:201-7. doi:9566491. Epub 1998/05/05. eng.

17.Imani FA, Iman ID, Hosseini DR, Karami A, Marashi SM. Design of a multiplex PCR method for detection of toxigenic-pathogenic in Vibrio cholerae. Asian Pac J Trop Med2013;6:115-8. doi: 23339912. Epub 2013/01/24. eng.

18.Farmer Iii J, Hickman F. The genera vibrio and photobacterium. 1th ed. Prok Springer Publication. 2006; P. 508-63.

19.Fach P, Perelle S, Grout J, Dilasser F. Comparison of different PCR tests for detecting Shiga toxin producing Escherichia coli O157 and development of an ELISA-PCR assay for specific identification of the bacteria. J Microbiol Meth 2003;55:383-92. doi: 14529959. Epub 2003/10/08. eng.

20.Smirnova NI, Agafonov DA, Zadnova SP, Cherkasov AV, Kutyrev VV. Algorithm of toxigenic genetically altered Vibrio cholerae El Tor biovar strain identification. Zhurnal Microbiol Epidemiol Immunobiol2014 :36-46. doi: 25051695. Epub 2014/07/24. rus.

21.Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, Ishibashi M, Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholera toxin producing Vibrio cholerae using a loop mediated isothermal amplification. BMC Microbiol2008;8:1-6.

22.Jesudason MV, Thangavelu CP, Lalitha MK. Rapid screening of fecal samples for Vibrio cholerae by a coagglutination technique. J Clin Microbiol1984;19:712-3. doi: 6736229. Pubmed Central PMCID: PMC271163. Epub 1984/05/01. eng.

23.Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Dartevelle S, Guenole A, et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of Vibrio cholerae O1 and O139 in stool samples. Clin Diag Lab Immunol 2003;10:476-8. doi: 12738652. PMC154973. Epub 2003/05/10. eng.

24.Rahman M, Sack DA, Mahmood S, Hossain A. Rapid diagnosis of cholera by coagglutination test using 4-h fecal enrichment cultures. J Clin Microbiol 1987;25:2204-6. dol: 3693549. PMC269441. Epub 1987/11/01. eng.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]

25.Roychowdhury A, Pan A, Dutta D, Mukhopadhyay AK ,Ramamurthy T, Nandy RK, et al. Emergence of tetracycline-resistant Vibrio cholerae O1 serotype Inaba, in Kolkata, India. Japanese J Inf Dis2008;61:128-9. doi:18362401. Epub 2008/03/26. eng.

26.Benenson A, Islam M, Greenough III W. Rapid identification of Vibrio cholerae by darkfield microscopy. Bull World Health Organ1964;30:827.

27.Finkelstein RA, LaBrec EH. Rapid identification of cholera vibrios with fluorescent antibody. J Bacteriol1959;78:886.

28.Lesmana M, Rockhill R, Sutanti D, Sutomo A. A coagglutination test to detect vibrio cholerae in feces alkaline peptone water cultures. South Asian J Trop Med Publ Health1982;13:377-9.

29.Ansorg RA, Heine S, Kraus CJ. Substitution of anti-human globulin by protein A-bearing staphylococci in the detection of Brucella antibodies. Med Microbiol Immunol1984;173:233-40. doi: 6513866. Epub 1984/01/01. eng.

30.Fricker CR ,Uradzinski J, Alemohammad MM, Park RW, Whelan C, Girdwood RW. Serotyping of campylobacters by co-agglutination on the basis of heat-stable antigens. J Med Microbiol1986;21:83-6. doi: 3950964. Epub 1986/02/01. eng.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]

Rapid Detection of Vibrio Cholera by a Coagglutination Complex using Staphylococcus aureus Including Protein A

Hadadian S[1], Aryafar P[2], Hesampour A[2], Sepahi M[1], Hosseini M[1]*

(Received: August 26, 2018 Accepted: March 6, 2019)

Abstract

Introduction: Vibrio cholera is a gram-negative bacterium that causes cholera which is an acute diarrheal illness. Cholera outbreak mostly happens in hot seasons when the bacteria reproduce rapidly in water contaminated with feces. Severe diarrhea and mortality have been the prevalent symptoms of cholera which affect the hygienic status and economic features of humans during centuries. There is a challenge currently to plan and propose a quick and reliable method to detect vibrio cholera which has been one of the fast growing and contagious disease in this decade.

Materials & Methods: New Zealand white rabbits were immunized with vibrio cholera Ogawa and Inaba whole cells. The obtained gamma globulin from the whole serum was purified through ammonium sulfate precipitation method and then concentrated in this study. Subsequently, the purity of these antigens increased with the use of mixed mode-chromatography in the next step. The purified antibodies were connected to staphylococcus aureus cowan 1 NCTC-8325 whole cells. Rectal swab samples were inoculated into an enriched Alkaline Peptone Water medium (pH 8.6) incubated for 5 h at 37 °C. One drop from each sample was mixed with one drop of vibrio cholera co-agglutination complex. Subsequently, the results were read in 2-3 min.

Findings: The obtained results showed 97%, 99%, and 98% of sensitivity, specificity, and accuracy from the proposed assay, respectively, compared to the standard culture methods. This proposed assay is considered as a rapid and reliable method to evaluate endemic or epidemic transmission of fatal illnesses.

Discussion & Conclusions: The proposed co-agglutination test is a simple, rapid, and reliable method to detect Vibrio cholera in fecal specimens. This method can be utilized to detect and control severe diarrhea which results from vibrio leading to the prevention of mortality, especially in areas with minimal laboratory facilities.

Keywords: Coagglutination, Complex coagglutination, Protein A, Staphylococcus aureus, Vibrio cholera

1. Dept of Nanobiotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2. Dept of Biology, Central Branch, Azad University, Tehran, Iran
Corresponding author email: hadadian@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.27.1.55]