

طراحی روش آگلوتیناسیون جهت تشخیص آنتی ژن مانو پروتئین جدا شده از مخمر کاندیدا آلیکنس

معصومه رجبی بذل^۱، محمد جواد رسایی^۲، مهتاب نوری فر^۳، *زهره فرح نژاد^۴

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۲/۱/۲۲

تاریخ اعلام وصول: ۹۱/۱۰/۶

چکیده

سابقه و هدف: مخمرهای جنس کاندیدا از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی هستند. آمار جهانی سیر فزاینده میزان شیوع و بروز عفونت‌های ناشی از کاندیدا را نشان می‌دهد. تشخیص این عفونت کشنده و مهاجم به علت غیر اختصاصی بودن علائم بالینی مشکل می‌باشد. هدف از این مطالعه طراحی روش سریع، آسان و حساس آزمایشگاهی استفاده از ذرات طلا برای تشخیص کاندیدا آلیکنس در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش آزمایشگاهی در ابتدا آنتی ژن مانو پروتئین دیواره سلولی کاندیدا آلیکنس با استفاده از روش افینیتی کروماتوگرافی و با استفاده از ستون کانکوالین A تخلیص و الکتروفورز گردید. سپس عصاره حاوی این آنتی ژن به خرگوش‌ها تزریق و پس از تولید آنتی بادی پلی کلونال در خرگوش علیه مانان، خونگیری از خرگوش انجام شد. سپس سرم آن با استفاده از ستون DEAE-سلولز، آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی علیه آنتی ژن مانان کاندیدا آلیکنس تخلیص گردید. در مرحله بعد این آنتی بادی به ذرات طلا متصل و آزمایش آگلوتیناسیون با استفاده از ذرات طلا جهت شناسایی مانو پروتئین انجام شد.

یافته‌ها: نتایج تست آگلوتیناسیون با چشم غیر مسلح و بر اساس تغییر رنگ از قرمز به آبی مشخص نمود که این آزمایش می‌تواند برای تشخیص سریع آسان و حساس جهت آنتی ژن کاندیدا آلیکنس استفاده شود.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که استفاده از روش‌های مبتنی بر سنجش ایمنی مانند آگلوتیناسیون ذرات طلا در صورتی که حساسیت آن افزایش یابد به علت سهولت و سرعت می‌تواند از سنجش‌های مناسب و دقیق برای کاندیدایازیس سیستمیک باشد.

کلمات کلیدی: کاندیدا آلیکنس، آنتی ژن، مانو پروتئین، آگلوتیناسیون، طلا

مقدمه

علت شایع عفونت‌های بیمارستانی محسوب شده و از کشت‌های خون بیماران مختلف جدا می‌شوند. میزان وقوع کاندیدا در خون در اروپا نیز افزایش چشمگیری یافته است. آلودگی با گونه‌های کاندیدا در بخش‌های پزشکی بسیار شایع بوده و تقریباً نیمی از آنها در بخش مراقبت‌های جراحی روی می‌دهد. میزان مرگ و میر ناشی از کاندیدیمی بسته به مراقبت‌های بیمارستانی از ۴۰ تا ۶۰٪

کاندیدایازیس از شایع‌ترین عفونت‌های قارچی در انسان است که توسط گونه‌های مختلف جنس کاندیدا به ویژه کاندیدا آلیکنس ایجاد می‌شود. وقوع آنها در سالهای اخیر همواره با استفاده از آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و افزایش بیماران مبتلا به نقص ایمنی، رشد چشمگیری یافته است (۱-۲). این عفونت امروزه چهارمین

۱- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه بیهوشی بالینی

۲- استاد، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی

۳- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه بیماری‌های عفونی

۴- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه قارچ‌شناسی (*نویسنده مسئول)

تلفن: ۸۵۹۵۲۹۰۶ آدرس الکترونیک: z.farhanezhad@yahoo.com

مرحله اول این تحقیق، آنتی ژن مانوپروتئین از دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس استخراج و سپس ذرات طلا تهیه و با آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی علیه مانو پروتئین کونژوگ گردید. در مرحله بعدی با استفاده از کونژوگ طلا-آنتی بادی تشخیص آنتی ژن مانوپروتئین با موفقیت انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور کشت انبوه مخمر کاندیدا آلبیکنس، از محیط کشت GYEP استفاده گردید. این محیط شامل گلوکز ۲٪، عصاره مخمر ۳٪ و پپتون ۱٪/۰ بوده و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین (۱۰۰ lu/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و کلرآمفنیکل (۵۰ mg/ml) به آن اضافه شد. مقدار ۲۰۰۰ میلی لیتر از این محیط تهیه و در ۴ ارلن استریل ۱۰۰۰ میلی لیتری تقسیم شدند. سوسپانسیونی از نمونه کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه به تعداد ۱۰۶ سلول در هر میلی لیتر و به میزان ۸ میلی لیتر تهیه شد. به هر کدام از ارلن‌ها ۲ میلی لیتر از این سوسپانسیون اضافه گردید و سپس ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ در دقیقه منتقل و در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از ۴۸ ساعت نمونه‌ها با بافر فسفات ۱۰ میلی مولار و با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار (۵ درجه سانتی گراد و دور ۸۰۰ g) ۳ مرتبه شستشو و جمع‌آوری شدند. از ۲۰۰۰ میلی لیتر محیط کشت مقدار ۲۰/۹۵ گرم کاندیدا آلبیکنس مرطوب به دست آمد.

به منظور تهیه عصار مخمری دیواره سلولی از روش Casanova و همکارانش با پاره‌ای تغییرات استفاده شد (۱۰). بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها جهت جداسازی نمک از پروتئین‌ها و تغییر محیط بافری نمونه، از کیسه دیالیز استفاده شد. برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین‌های بدست آمده در تمام مراحل از این روش استفاده گردید. در این روش رنگ کوماسی بریلیانت بلو G وارد ساختمان ملکول پروتئین می‌شود. ماکزیمم جذب کمپلکس حاصل در طول موج ۵۹۵-۴۲۵ nm می‌باشد و در این شرایط از استاندارد پروتئینی نیز استفاده می‌شود (۱۰).

جهت تخلیص عصاره مانو پروتئین دیواره سلولی از کروماتوگرافی تمایلی (Affinity chromatography) استفاده شد. کانکوالین A تمایل زیادی برای اتصال به واحدهای مانوزیلی دارد. از آنجا که

متغیر است (۴-۳). فقدان علائم اختصاصی در مرحله بالینی و دشواری در تشخیص به موقع و اختصاصی عفونت کاندیدایی از دلایل مشخص این مرگ‌ومیر است (۵-۶). با اینکه پیشرفت‌هایی در زمینه آزمایشات کشت خون انجام شده است اما این روش هنوز حساسیت کافی را ندارد. بهمین دلیل دانشمندان برای مواجهه با این مشکلات روش‌های سرولوژیک ابداع نموده‌اند. برتری این روش‌ها سادگی و سهولت آنها می‌باشد. بسیاری از تست‌های سرولوژیک که در سال‌های اخیر برای کمک به تشخیص کاندیدایزیس سیستمیک یا احشایی ابداع شده‌اند به جای آنتی بادی، آنتی ژن‌های کاندیدا رادر خون جستجو می‌نمایند. تست‌های سرولوژی متعددی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند که در میان آنها آگلوتیناسیون ذرات لاتکس و روش‌های الایزا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به علت سرعت، دقت و حساسیت به صورت روزمره استفاده می‌شوند (۶-۷).

از سال ۱۹۸۰ به جای استفاده از کونژوگ لاتکس در تست‌های سریع تشخیصی مانند تست‌های آگلوتیناسیون که در آن زمان معمول بود از کونژوگ طلا بیشتر استفاده گردید. با توجه به محاسنی که برای ذرات کلوئیدی طلا شمرده شده است می‌توان از آنها برای تشخیص آنالیت‌ها استفاده نمود. از مزایای کلوئید طلا این است که در صورتی که شرایط لازم برای جذب ماکرومولکول به ذره طلا تعیین گردد (مثل غلظت و pH)، این ذرات پایداری لازم را نشان می‌دهند. استفاده از کلوئید طلا بر نشان‌هایی مثل گلبول قرمز و لاتکس ارجحیت دارد. با توجه به عملکرد ذرات طلا در محدوده گسترده‌ای از pH از آنها می‌توان برای اتصال به انواع ماکرومولکول‌ها از جمله آنتی بادی‌ها استفاده نمود. این سنجش‌ها سریع بوده و در زمان کوتاهی در حدود چند دقیقه، نتایج آگلوتیناسیون به طور چشمی قابل مشاهده است و مواد نیاز به نگهداری در یخچال ندارند (۸-۹).

باتوجه به توضیحات فوق که مزایای استفاده از طلا در روش‌های سرولوژی را نشان می‌دهد امروزه استفاده از آن در آزمایشات سرولوژی و ایمونوکروماتوگرافی رایج شده است. همچنین منطق استفاده از این روش‌ها بر این اساس است که در زمان کوتاهتری نسبت به کشت خون و قبل از گسترش بیماری بتواند نتیجه قابل قبولی فراهم نماید. لذا طراحی یک روش تشخیصی سریع و آسان جهت مخمر کاندیدا آلبیکنس ضروری است. بدین منظور در

و به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. این آنتی‌بادی از شرکت سیگما خریداری گردید. در پایان انکوباسیون، چاهک‌ها به مدت ۵ بار شسته و محلول سوپسترای TMB به آنها اضافه شد. پس از ده دقیقه واکنش با استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۵ نرمال متوقف و رنگ در ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

برای جداسازی آنتی‌بادی از سرم خرگوشی، از نمک سولفات آمونیوم ۳۷٪ استفاده شد. سولفات آمونیوم سائیده شده به آرامی به ظرف حاوی سرم که در حال مخلوط شدن توسط مگنت بود اضافه گردید. این عمل در سرما و در داخل ظرف یخ انجام شد. سپس این سوسپانسیون در ۳۵۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. بعد از جدا کردن محلول رویی، رسوب در حداقل بافر فسفات ۱۵ میلی‌مولار با (pH=۷/۵) حل شد. محلول فوق را در کیسه دیالیز با ۱۲۰۰۰ Cut off ریخته و در مقابل بافر فسفات ۱۵ میلی‌مولار (pH=۷/۵) به مدت ۲۴ ساعت با سه بار تعویض دیالیز گردید (۹).

برای تخلیص ایمونوگلوبولین خرگوشی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی ژل مورد استفاده جهت این روش دی‌اتیل‌امینو اتیلن سلولز (DEAE- سلولز) می‌باشد. گروه تعویض یونی یون مثبت مستقر بر روی گروه آمین است که به صورت شارژ شده باقی می‌ماند و قابلیت و کارکرد در pH بین ۲ تا ۹ را دارا می‌باشد. آماده‌سازی ژل فوق و تخلیص آنتی‌بادی پلی کلونال انجام گردید.

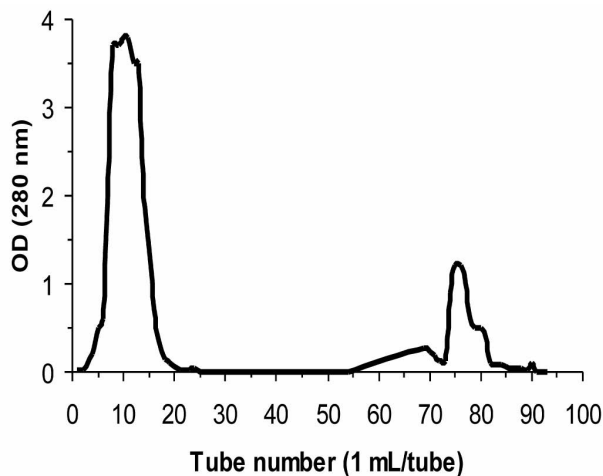
پس از تهیه ذرات طلای نانومتری و تنظیم pH آن با استفاده از کربنات پتاسیم ۰/۲ مولار، آن را فیلتر کرده، سپس محلول کلونید طلا را در داخل ظرف مناسب ریخته و در دمای آزمایشگاه و در حالیکه به طور مداوم بهم می‌خورد، آنتی‌بادی به آن اضافه گردید. غلظت نهایی برای این پروتئین یک میلی گرم در میلی لیتر مشخص گردید. پس از اضافه نمودن پروتئین، دو الی سه دقیقه اجازه داده شد تا به آرامی در دمای آزمایشگاه مخلوط گردد. سپس از محلول یک درصد پلی اتیلن گلیکول ۲۰/۰۰۰ اضافه نموده و پنج دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا خوب مخلوط شوند بعد از این مرحله، محتویات به لوله سانتریفوژ منتقل شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ اول، $\frac{4}{5}$ حجم مایع رویی بیرون ریخته شد و رسوب در باقیمانده محلول به آرامی حل شده سپس

مانوپروتئین دارای واحدهای پلی مانوز می‌باشد، اغلب محققین برای تخلیص آن از این ترکیب استفاده نموده‌اند. در این مطالعه نیز برای تخلیص مانوپروتئین عصاره خام دیواره سلولی کاندیدا از ژل کانکاولین A متصل به سفادکس که از شرکت سیگما خریداری گردید مطابق با روش گفته شده در پروتکل آن شرکت استفاده شد. جهت تهیه ذرات طلا و پوشانیدن این ذرات با آنتی‌بادی لازم است اندازه، pH و غلظت مناسب به دست آید که این پارامترها از مطالعه رجیبی و همکاران در تهیه ذرات طلا بکار گرفته شد (۹-۱۱). آنتی‌بادی پلی کلونال در خرگوش به منظور مطالعه اولیه برای سنجش مانوپروتئین با استفاده از طلای کلونیدی از آنتی‌بادی پلی کلونال خرگوشی استفاده شد. این آنتی‌بادی به شرح زیر تولید و تخلیص گردید.

دو عدد خرگوش سفید از انستیتو رازی خریداری شد. سپس تعداد ۱۰۷ سلول کاندیدا آلبیکنس شمارش شده با لام نئوبار به یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و به آن یک میلی لیتر ادجوانت کامل فروند اضافه شد و خوب مخلوط گردید. سپس یک میلی لیتر از این مخلوط به شکل داخل عضلانی به خرگوش (به میزان ۲۵۰ میکرولیتر در هر عضله) تزریق گردید.

به منظور تزریق‌های یادآور، ۱۰۷ سلول کاندیدا آلبیکنس در یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی حل شده و سپس یک میلی لیتر ادجوانت ناقص اضافه گردید و پس از مخلوط شدن کامل به نقاط مختلف دست و پای خرگوش‌ها تزریق شد. تزریق یادآور یک هفته بعد از تزریق اول صورت گرفت. تزریقات یادآور هر ۳ هفته تا مدت ۳ ماه تکرار شد. برای سنجش تیتراژ آنتی‌بادی مناسب ۱/۲۰۰۰ بعد از یک ماه هر ۲ هفته الایزا (ELISA) انجام شد.

به منظور تعیین تیتراژ آنتی‌بادی پس از هر خونگیری از حیوان و یا استفاده از روش الایزا، مقدار ۵ میکروگرم از آنتیژن مانوپروتئین را در کف چاهک‌ها پوشانیده و پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C پلیت‌ها با بافر PBS (pH=۷/۲) شسته و با استفاده از محلول یک درصد سرم آلبومین گاوی (BSA) بلوکه شدند. سپس پلیت‌ها شسته و رقت‌های مختلف آنتی‌بادی در بافر ۱۰ میلی مولار فسفات با pH=۷/۲ به آن اضافه و به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. در پایان مدت انکوباسیون چاهک‌ها شسته و به آنها آنتی‌بادی ثانویه ضدایمونوگلوبولین خرگوش که با HRP نشان‌دار شده بود اضافه



شکل ۱- منحنی جذب نوری نمونه‌های جمع‌آوری شده از ستون کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از کانکوالین A.

مربوط به پروتئین‌های ناخواسته ($OD = 3/90$) و پیک دوم مربوط به تخلیص مانوپروتئین می‌باشد ($OD = 1/7$) که به کانکوالین A متصل بوده و با استفاده از قند α - متیل D - مانوزیل آزاد شد. (شکل ۱). بررسی الگوی الکتروفورزی نمونه‌های جمع‌آوری شده مربوط به پیک دوم با استفاده از SDS-PAGE یک باند قوی را در محدوده ۵۵ کیلودالتون و یک باند بسیار ضعیف در محدوده ۳۵ کیلودالتون را نشان می‌دهد (شکل ۲).

نتایج حاصل از آگلوتیناسیون ذرات طلا پوشیده با آنتی‌بادی پلی‌کلونال تهیه شده در خرگوش با آنتی‌ژن مانوپروتئین دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس و عصاره قارچ اسپریلوس فومیگاتوس پس از پوشانیدن ذرات طلا با آنتی‌بادی پلی‌کلونال، مقادیر مساوی از این محلول در داخل ۴ میکروتیوب ریخته شد. ۲ تیوب به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و به آنها فقط BSA و بافر فسفات اضافه گردید و به دو تیوب دیگر به ترتیب عصاره اسپریلوس

به آن بافر فسفات حاوی یک درصد BSA اضافه شد. میزان بافر اضافه شده به قدری است که برابر حجم اولیه کلویید طلا می‌شود و مجدداً در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتیگراد گردید. بعد از خالی کردن مایع رویی، رسوب در بافر فسفات حاوی یک درصد BSA به میزان چهار برابر حجم رسوب حل گردیده و در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه به مدت ۳۰ دقیقه سانتیگراد شده بعد از خالی کردن مایع رویی به همان میزان قبلی، رسوب در باقیمانده بافر حل شده و در تاریکی و دمای چهار درجه نگهداری شد.

جهت آزمایش آگلوتیناسیون، ذرات طلای پوشیده شده با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی را در مقادیر مساوی داخل سه میکروتیوب ریخته و به آنها غلظت‌های مساوی از بافر فسفات (به عنوان کنترل منفی)، BSA (به عنوان کنترل منفی)، عصاره خام دیواره مانوپروتئین (به عنوان تست) اضافه گردید. همچنین عصاره اسپریلوس فومیگاتوس نیز به عنوان آنتی ژن دارای واکنش متقاطع (به دلیل شباهت) بررسی شد. این آزمایش‌ها به تناوب تکرار شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تولید کشت انبوه کاندیدا آلبیکنس و تعیین میزان پروتئین به دست آمده از عصاره خام دیواره سلولی و مانوپروتئین تخلیص شده با روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از روش برادفورد در جدول ۱ نشان آورده شده است.

نتایج حاصل از تخلیص مانوپروتئین کاندیدا آلبیکنس با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی (Con-A) در شکل ۲ آورده شده است. این شکل منحنی جذب نوری نمونه‌های جمع‌آوری شده از ستون کروماتوگرافی را با دو پیک (Peak) را نشان می‌دهد. پیک اول

جدول ۱- نتایج حاصل از تولید کشت انبوه و میزان غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد در عصاره خام و مانوپروتئین تخلیص شده از مخمر کاندیدا آلبیکنس

NO:	Steps	Amount	Condition	Sample
۱	۲L culture	۲۲ g	Wet	C. albicans
۲	Freeze dry	۱۳ g	Dry	C. albicans
۳	Crud extract	۳۰ mg	---	Cell wall extract
۴	ConcanavalinA	۱/۵ mg	---	Protein purified

بحث و نتیجه گیری

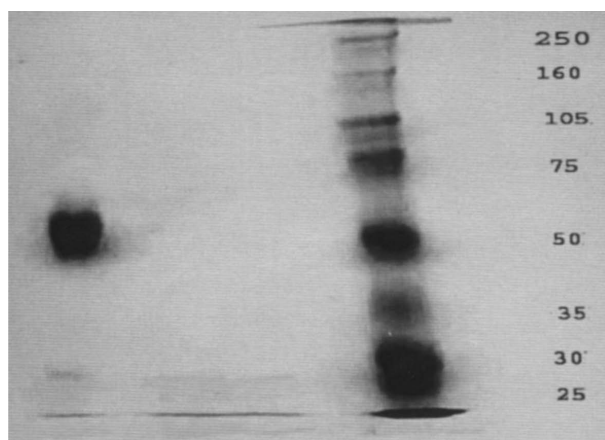
کاندیدیمیا در سالهای اخیر چهارمین علت شایع سپسیس های بیمارستانی بوده و در حدود ۸٪ عفونت های بیمارستانی را تشکیل می دهد. میزان مرگ و میر ناشی از این عفونت ها بسیار بالاتر از موارد مشابه یعنی سپسیس های باکتریایی می باشد و تخمین زده می شود که این میزان در حدود ۸۰-۳۸٪ باشد (۱-۵).

از آنجائیکه پیش آگهی این بیماری وخیم می باشد و درصد مرگ و میر ناشی از آن بالا است، لذا تشخیص سریع و درمان این عفونتها ضروری است. از موارد تشخیصی کشت خون می باشد که علیرغم بالاترین میزان مثبت در اغلب بیماریهای عفونی، در این بیماران معمولاً منفی گشته و یا با تأخیر مثبت می گردد. بیوپسی نیز در اغلب این بیماران به علت تهاجمی بودن توصیه نمی گردد. به همین دلیل روشهای سرولوژی در دهه های اخیر به طور وسیعی برای تشخیص کاندیدایازیس سیستمیک مورد استفاده قرار گرفتند.

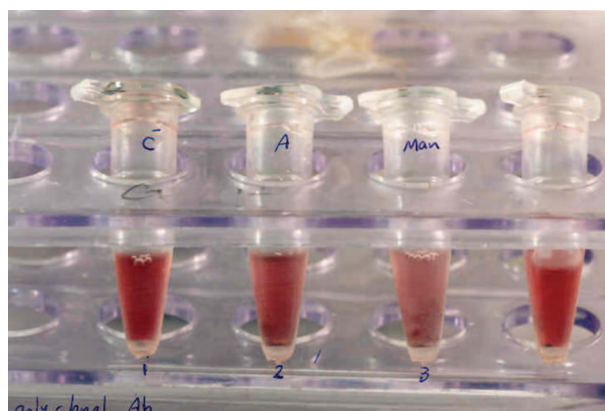
در طراحی یک تست آزمایشگاهی ویژگی و حساسیت بالا حائز اهمیت می باشد تا بتواند تفاوت میان کلونیزاسیون و عفونت را تشخیص دهد. تستهای جدید باید روشهای قبلی را بهینه کرده و سریعتر پاسخ دهند تا امکان تشخیص بهتر اشکال مهاجم بیماری فراهم شود. روش هایی چون رادیوایمونواسی، هم آگلوتیناسیون، کانترایمونوالکتروفرورز نیز به طور تجربی مورد استفاده قرار گرفته اند. اما در کارهای روزمره از آنها استفاده نمی شود. اغلب این تست ها از مانان به عنوان یک مارکر تشخیص در خون استفاده کرده اند. مانان ها در مقایسه با گلوکان بسیار ایمونوژن هستند و متشکل از تعداد زیادی قند مانوپیرانوز هستند. فاکتورهای آنتی ژنیک موجود در مانان باعث تحریک ایمنی هومورال و تولید آنتی بادی می شود. این آنتی بادی ها پلی کلونال و یا منوکلونال بوده و می توان از آنها در درمان و تشخیص آزمایشگاهی استفاده نمود (۸-۱۲).

امروزه استفاده از تستهای سریع در زمان کوتاهی توجه محققین را به خود جلب نموده است. اغلب این روشها براساس آگلوتیناسیون، ایمونوکروماتوگرافی و روش های ملکولی می باشد.

استفاده از کلونید طلا به دلیل بررسی نتایج با چشم غیر مسلح و نیز پایداری ذرات و محدوده پایداری وسیع pH آن که بین ۴ تا ۱۰ می باشد بر نشان هایی مثل گلبول قرمز و لاتکس در طراحی تست های سریع ارجحیت دارد. همچنین با توجه به انجام واکنش



شکل ۲- بررسی الگوی الکتروفروری مانوپروتئین تخلیص شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی کانکاولین.



شکل ۳- نتایج چشمی حاصل از واکنش آگلوتیناسیون ذرات طلای پوشیده شده با آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی به ترتیب با BSA (کنترل سمت راست، شماره ۱)، آنتی ژن مانوپروتئین دیواره سلولی کاندیدا آلبیکنس (شماره ۲)، با عصاره قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس (شماره ۳) و کنترل منفی با بافر فسفات (سمت چپ، شماره ۴).

فومیگاتوس و آنتی ژن مانوپروتئین تخلیص شده از دیواره کاندیدا آلبیکنس با غلظت های مشخص اضافه شد. پس از ۲ تا ۵ دقیقه مشاهده شد که میکروتیوب حاوی BSA بدون تغییر باقی مانده است. اما دو میکروتیوب دیگر که به آنها مانوپروتئین و عصاره آسپرژیلوس فومیگاتوس اضافه شده بود، تغییر رنگ داده که در مورد مانوپروتئین از قرمز به سمت بنفش کمرنگ رفته و سپس بی رنگ گردیدند و شروع به رسوب نمودند. تغییر رنگ مربوط به آسپرژیلوس فومیگاتوس از شدت کمتری برخوردار بود. نتایج از طریق چشم کاملاً مشهود بوده و در شکل ۳ قابل مشاهده می باشد. همچنانکه در شکل مشهود است این تغییر رنگ در رابطه با آنتی ژن مانوپروتئین کاندیدا آلبیکنس بسیار مشخص تر می باشد.

شده در آزمایش توانست آنتی ژن مانوپروتئین جدا شده از مخمر کاندیدا آلبیکنس را شناسایی نماید. شناسایی اختصاصی مانان توسط تست سریع طراحی شده حائز اهمیت می باشد اما بررسی واکنش متقاطع و شناسایی اختصاصی نشان داد که کونژوگه طلا-آنتی بادی پلی کلونال توانست عصاره قارچ اسپرژیلوس فومیگاتوس را به طور ضعیف نیز شناسایی نماید. البته همچنانکه نتایج نشان می دهد تغییرات رنگ در آزمایشات آگلوتیناسیون ذرات طلا برای آنتی ژن مانوپروتئین کاندیدا آلبیکنس نسبت به اسپرژیلوس فومیگاتوس بیشتر است و جهت افزایش اختصاصیت این آزمایشات بایستی در آزمایشات آتی از آنتی بادی های اختصاصی تر مانند آنتی بادی های منوکلونال استفاده نمود. با توجه به اینکه تست طراحی شده در این مطالعه قادر به شناسایی اولیه بوده که این امر حائز اهمیت می باشد. پس از بکارگیری آنتی بادی منوکلونال، ارزیابی و غربالگری نمونه ها با استفاده از سایر روش ها انجام خواهد شد. طراحی تست سریع برای آنتی ژن های قارچی با گزارش کمتری همراه می باشد. طراحی تست های سریع برای سایر عوامل عفونی گزارش شده است که در مقایسه با سایر تست ها از ویژگی و حساسیت لازم برخوردار می باشند. با توجه به اینکه طراحی تست سریع در ایران برای موادی مانند مورفین، آلبومین و... صورت پذیرفته است. این اولین گزارش از طراحی تست تشخیص سریع جهت شناسایی مانان قارچ در ایران می باشد و تحقیقات جهت بهینه نمودن این تست ادامه دارد. (۱۸-۱۳)

در یک مرحله و بررسی نتایج از طریق چشم غیر مسلح و افراد مبتدی می توان آنالیت هایی بسیاری از جمله پروتئین را مورد بررسی قرار داد.

در این مطالعه از سنجش های ایمنی مانند آگلوتیناسیون ذرات طلا بجای لاتکس، برای تشخیص مانوپروتئین استفاده شد. در مرحله اول آنتی ژن مانوپروتئین را که آنتی ژن اصلی و ایمنو دو مینانت سلول کاندیدا آلبیکنس است انتخاب گردید و با استفاده از کانکوالین A تخلیص گردید.

نتایج حاصله از آنالیز الکتروفورزی عصاره خام و نمونه تخلیص شده با استفاده از ژل ۱۲٪ سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید برای عصاره خام حدود ۲۲ باند پروتئین را در محدوده ۲۵۰ کیلودالتون تا ۳۰ کیلودالتون و برای مانان یک باند قوی در محدوده ۵۵ کیلودالتون و یک باند بسیار ضعیف در محدوده ۳۵ کیلودالتون را نشان داد. استفاده از رنگ آمیزی نیترا نقره برای نمونه مانوپروتئین تخلیص شده از ستون کانکوالین A هیچگونه باند دیگری را نشان نداد.

جهت طراحی روش تشخیص سریع، ذرات طلا با اندازه های متفاوت تهیه شده و با توجه به زمان پایداری این ذرات، ذرات بیست نانومتری انتخاب گردید. مرحله بعد بهینه سازی غلظت آنتی بادی بر روی ذرات طلا و پایداری آنها می باشد. کونژوگه آنتی بادی -طلا بدست آمده به مدت شش ماه بررسی شده و نتایج نشان از دوام و کیفیت لازم برای بررسی مانان می باشد. نتایج آزمایشات آگلوتیناسیون با استفاده از ذرات طلا نشان داد که کونژوگه آنتی بادی - طلا کت

References

- Giri S, Kindo AJ. A review of Candida species causing blood stream infection. Indian J Med Microbiol 2012; 30 (3): 270-8. PubMed PMID: 22885191.
- Pulimood S, Ganesan L, Alangaden G, Chandrasekar P. Polymicrobial candidemia. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44 (4): 353-7. PubMed PMID: 12543540.
- Tharayil JG, Shanker V, Talaulikar G, Mathews MS, Abraham AM, et al. Epidemiology of systemic mycoses among renal-transplant recipients India. Transplantation 2003; 75 (9): 1544-51.
- Garbino J, Kolarova L, Rohner P, Lew D; Pichna P, et al. Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tert care hospital. Medicine (Baltimore) 2002; 81 (6): 425-33.
- Mahfouz T, Anaissie E. Prevention of fungal infections in the immunocompromised host. Curr opin Investing Drugs 2003; 4 (8): 974-96.
- Sing N. Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors ant the impact of antimicrobial use practices (Review article). Clinical infectious Disease 2001; 23: 1692-1996.
- Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ.. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA; Candida.in Clinical Mycology, Churchill Livingstone, New York, 2003, P: 195-229.
- Chandler J, Gurmin T, robinson N. The place of gold rapid test. IVD Technology 2000; 6 (2): 37-49.
- Rajabi-Bazl M. Development of a Rapid Immunochromatography Test for Low Level Morphine Detection. Tehran: Tarbiat Modares University; 2002. [Persian]

- 10- Casanova M, Chaffin WL. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *J Gen Microbiol* 1991; 137 (5): 1045-51. PubMed PMID: 1865179.
- 11- Rajabibazl M, Javad Rasaee M, Tiraihi T, Naderi Sohi AR, Hallaj S. Development of Oral Morphine Rapid Test by Using Yolk Immunoglobulin. *Journal of Applied Research* 2010; 10 (3): 134.
- 12- Kozel TR, MacGill RS, Percival A, Zhou Q. Biological activities of naturally occurring antibodies reactive with *Candida albicans* mannan. *Infect Immun* 2004; 72 (1): 209-18. PubMed PMID: 14688098. Pubmed Central PMCID: 343987.
- 13- Yang D, Ma J, Zhang Q, Li N, Yang J, Raju PA, et al. Polyelectrolyte Coated Gold Magnetic Nanoparticles for Immunoassay Development: Toward Point of Care Diagnostics for Syphilis Screening. *Anal Chem* 2013. PubMed PMID: 23735054.
- 14- Ley B, Thriemer K, Ame SM, Mtove GM, von Seidlein L, Amos B, et al. Assessment and comparative analysis of a rapid diagnostic test (Tubex (R)) for the diagnosis of typhoid fever among hospitalized children in rural Tanzania. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 147. PubMed PMID: 21609455. Pubmed Central PMCID: 3123569.
- 15- Genc O, Buyuktanir O, Yurdusev N. Rapid immunofiltration assay based on colloidal gold-protein G conjugate as an alternative screening test for bovine and ovine brucellosis. *Trop Anim Health Prod* 2012; 44 (2): 213-5. PubMed PMID: 22102014.
- 16- Wang XY, Ansaruzzaman M, Vaz R, Mondlane C, Lucas ME, von Seidlein L, et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 17. PubMed PMID: 16451731. Pubmed Central PMCID: 1402302.
- 17- Dehghannezhad A, Paknejad M, Rasaee MJ, Omidfar K, Seyyed Ebrahimi SS, Ghahremani H. Development of a nanogold-based immunochromatographic assay for detection of morphine in urine using the Amor-HK16 monoclonal antibody. *Hybridoma (Larchmt)* 2012; 31 (6): 411-6. PubMed PMID: 23244319.
- 18- Omidfar K, Kia S, Larijani B. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic test strip for screening of microalbuminuria. *Hybridoma (Larchmt)* 2011; 30 (2): 117-24. PubMed PMID: 21529283.

Development of Agglutination Test for Detection of isolated Mannoprotein Antigen from Candida Albicans

Masoumeh Rajabibazi¹, Mohammad Javad Rasaee², Mahtab Nouri Fard³, *Zohrea Farahnejad⁴

Received: 26 Dec 2012

Accepted: 11 Apr 2013

Abstract

Background: Candida albicans is one of the most common causes of hospital infections. The aim of this study was to develop a rapid, easy and sensitive way to detect candida albicans.

Material and Methods: Polyclonal antibodies were prepared in rabbits. The antibodies were purified by salt concentration and Ion exchange chromatography. The purified antibody was coated onto the colloidal gold.

Results: Color change (red to blue) was observed when the purified antigens (mannoprotein of Candida albicans cell wall) were added to Polyclonal antibodies. The method was sensitive and easy.

Conclusion: This study indicated that using colloidal gold particle agglutination method can be used for accurate and rapid candida detection Method.

Keywords: Candida Albicans, Mannoproteins, Antigen, Agglutination, Gold

1- Assistant Professor, Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medicine, Tehran, Iran

2- Professor, Medical Biotechnology Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Infectious Disease Department, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- (*Corresponding Author) Assistant Professor, Mycology Department, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Tel: +98 21 85952906 E-mail: z.farahnejad@yahoo.com