
***Vibrio cholerae* O1 ve O139 Serogrubuna Ait Aglütinan Antiserumların Hazırlanması, Standardizasyonu ve Pratik Sahada Kullanımı**

Mete TEZ*, **Orhan BAYLAN****, **Mustafa ÖZYURT****, **Levent DOĞANCI****

* Gölçük Deniz Hastanesi, KOCAELİ

** Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada, serolojik identifikasyonda kullanılmak üzere *Vibrio cholerae* O1 ve O139 serogrublarına ait aglütinan antiserumların elde edilmesi amaçlanmıştır. O1 serogrubuna ait Ogawa ve Inaba monovalan antiserumlarının elde edilmesi için polivalan antiserumlar, çapraz reaksiyon verdikleri Ogawa ve Inaba serotipleriy-le karşılıklı olarak absorbe edilmiştir. Absorbsiyon işlemi, aynı zamanda tüm *V. cholerae* serogrublarında ortak antijen olarak bulunabilen R antijeni taşıyan bir R tip *V. cholerae* suşu, *Salmonella* grup N, *Shigella flexneri* ve *Shigella boydii* ile de yapılmıştır. O139 serogrubuna ait antiserumlar ise çapraz reaksiyon verdikleri *V. cholerae* O22 ve O155 serogrubları ve R tip *V. cholerae* suşu ile absorblanmıştır. Antiserumların standart olarak kullanılabileceğini kanıtlamak amacı ile antiserum üretmekte kullanılan bakterilerin serotipe özgü olan lipopolisakkarid (LPS)'leri ELISA kuyucuklarına kaplanarak elde edilen antiserumların özgünlüğü gösterilmiştir. Tüm antiserumların 450 nm'de kendi LPS'leri ile verdikleri absorbansın 0.2'nin üzerinde, kaplanan diğer LPS'ler ile verdikleri absorbansların ise 0.2'nin altında olduğu saptanmıştır ($p= 0.0001$). Böylece üretilen serotip ve serogruba özgü antiserumların, *V. cholerae*'nin serolojik identifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Vibrio cholerae*, Özgül antiserum üretimi

SUMMARY

Production and Standardization for Practicle Use of Agglutinant Antisera of *Vibrio cholerae* Serogroups O1 and O139

In this study, agglutinant antisera of the serogroups of *Vibrio cholerae* O1 and *V. cholerae* O139 have been obtained in order to use for serological diagnosis. Obtaining of Ogawa and Inaba monovalent antisera of O1 serogroup have been bilaterally absorbed through Ogawa and Inaba serotypes and an R type *V. cholerae* strain holding R antigen which may be a common antigen in all *V. cholerae* serogroups, and *Salmonella* group N, *Shigella flexneri* and *Shigella boydii*. The antiserum belongs to O139 serogroup, however, has been absorbed through the bacteria belonging to O22 and O155 serogroups which they demonstrate cross reaction and the R type *V. cholerae* strain. To substantiate standart usability of antisera, the bacteria have been used for producing of antisera which contains lipopolysaccharides peculiar to serotypes so that lipopoly-

saccharides have been coated to the wells of ELISA plates and distinction of obtained antisera have been proved accordingly. It has been determined that the absorbance level of all antisera through their lipopolysaccharides at 450 nm, were over the absorbance value of 0.2, on the other hand, their absorbance level through other lipopolysaccharides were below 0.2 ($p= 0.0001$). Thus, it has been proven that the produced antisera peculiar with serotypes and serogroup could be used successfully for serological identification of *V. cholerae*.

Key Words: *Vibrio cholerae*, Serodiagnosis, Production of specific antisera

Kolera, XIX. yüzyıl ile birlikte tüm dünyada en önemli sağlık sorunu olmuş ve ilk pandeminin görüldüğü 1817'den bu yana O1 serogrubunun neden olduğu yedi pandemi ortaya çıkmıştır^[1]. 1817-1961 yılları arasında görülen altı pandemi *Vibrio cholerae* O1'in klasik biyotipi ile olmuştur. İlk olarak 1905 yılında Gotschlich'in izole ettiği *V. cholerae* O1 El Tor biyotipi, halen güncel olan yedinci pandeminin sorumlusudur^[2]. Klasik biyotip, 1982'de Bangladeş'de görülen ve devam eden salgınlar hariç, günümüzde pandemik salgınlar şeklinde görülmemektedir^[3].

Kolera, kuluçka devrinin kısalığı, kısa seyirli ve etkin bir şekilde mücadele edilmediğinde öldürücü olması, ancak bu arada yapılacak tedavinin çok değer taşıması ve sosyoekonomik şartlarla yakından ilgili salgınlar yapması nedeniyle önemini korumakta, günümüzde dünyanın birçok bölgesinde yeni sürprizlerle karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan birisi, birçok antibiyotiğe dirençli yeni *V. cholerae* suşlarının ortaya çıkmış olması, diğeri belki de asıl önemlisi, 1992 Ekim'inde Hindistan ve Bangladeş'de *V. cholerae* O139 Bengal adı verilen yeni bir serogrubun belirlenmesidir. Klasik kolera etkeni gibi şiddetli epidemiler yapması, toksijenik özellik taşıması ve VIII. pandeminin etkeni olacağı gözü ile bakılması, tüm dikkatlerin bu yeni nonO1 (O139 Bengal) serogruba yönelmesine neden olmuştur^[3,4].

V. cholerae'nin taksonomisi değişik serolojik ve patolojik özellikler göstermesi nedeniyle oldukça karışıktır. Biyokimyasal özelliklerine göre *V. cholerae* klasik ve El Tor olmak üzere iki biyotipe ayrılır. Tüm kolera vibrioları, kirpik (H) ve somatik (O) olmak üzere başlıca iki çeşit antijen içerirler. H antijenleri ısıya dirençsiz, O antijenleri ise lipopolisakkarid (LPS) yapısında ve ısıya dirençlidir. Bazı kolera suşlarında ise ancak iki saat 100°C'de ısıtmakla harap olan ve O antijenlerini örterek spesifik antiserumları ile reaksiyon vermelerini önleyen mukoid (M) antijenler bulunur. *V. cholerae*'nin serolojik gruplandırılmasında önemli olan O antijenleridir ve LPS'ye karşı oluşmuş antikorlar serogruplar için spesifiktir. O antijenleri, dış membranın LPS komponenti içindedir. Diğer gram-negatif bakterilerde olduğu gibi LPS,

lipid A, polisakkaridin "core" bölgesi ve türler arasındaki farklılıkları sağlayan O spesifik polisakkarid zinciri içerir. Lipid A biyolojik aktivitelerden, polisakkarid zincirler ise serolojik özelliklerden sorumludur. H antijenleri ise ortak yapıdadır^[5-8].

Serotiplerinin belirlenmesinde kullanılan üç sistem geliştirilmiştir. En sık kullanılan iki sistem Smith ve Shimada-Sakazaki tiplene sistemleridir. Smith sisteminde canlı bakteriler, diğer sistemde ise ölü bakteriler kullanılarak antiserumlar elde edilmektedir. Üçüncü sistem ise Siebeling ve arkadaşlarının geliştirilmiştir^[1]. Klasik kolera etkeni olan O1 serogrubu, içerdikleri A, B ve C antijenik determinantlarına göre Ogawa, Inaba ve Hikojima serotiplerine ayrılmaktadır^[2,5]. Her geçen gün sayıları artan *V. cholerae* serogruplarının bugün için Sakazaki sisteminde 155 tanesi tanımlanmış bulunmaktadır^[9]. O1 antiserumları ile aglutinasyon vermeyen serogruplara "nonagglutinable (NAG)" *Vibrio*'lar, "noncholerae" *Vibrio*'lar (NCV) veya nonO1 *V. cholerae*'lar denilmektedir^[5]. Bu serogruplardan en önemlisi, *V. cholerae* O139 serogrubudur^[4].

V. cholerae O1 serogrubuna ait antiserumlar, aglutinasyon testlerinde *Brucella*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Escherichia* cinsine ait bakteriler ve R tip *V. cholerae* suşları ile, *V. cholerae* O139 serogrubuna ait antiserumlar ise *V. cholerae* O22, *V. cholerae* O155, R tip *V. cholerae* (CA385) ve *Aeromonas trota* suşları ile çapraz reaksiyon vermektedir^[9,10].

Bu çalışmamızda *V. cholerae* O1 serogrubuna ait Ogawa ve Inaba serotipleri ile O139 serogrubuna karşı serolojik identifikasyonda kullanılabilecek antiserumları üretmeyi amaçladık. Amacımız, çalışma sonunda çok kıymetli bir ürünün elde edilmesi ve bunun kalite kontrol yöntemleri ile güvenilirlik testlerinden geçirilerek teknolojik potansiyelimizin ortaya konması olmuştur. 1994 yılında gözlenen Ankara epidemisinde görüldüğü gibi dar zaman içinde elde yeterli düzeyde olmayan biyolojik ürünlerin ve yerli kaynaklara dayandırılmayan tıbbi tüketimlerin ortaya çıkarabileceği olumsuzluklar açısından, üretime yönelik bu tip çalışmaların önemine dikkat çekmek istedik^[11].

MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda, antikor üretilmesi ve absorpsiyon işlemleri için kullanılan bakterilerden *V. cholerae* O1 klasik Inaba (569B), *V. cholerae* O139 (MO45), *V. cholerae* O22 (169-68), R tip *V. cholerae* (CA385) Japonya Uluslararası Tıp Merkezi Araştırma Enstitüsü'nden, *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (AH170), *V. cholerae* O155 ve *Salmonella* grup N'ye ait bir suş Bangladeş Uluslararası İshalli Hastalıklar Araştırma Merkezi'nden, *Shigella flexneri* ve *Shigella boydii* ise Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA), Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri koleksiyonundan sağlandı. Anılan bakteriler çalışmalarda kullanılmaya kadar %15 gliserol içeren "brain-heart infusion broth"da, -70°C'de saklandı.

Antiserum üretimi, 569B, MO45 ve AH170 suşları ile 2.5-3.5 kg ağırlığındaki dört haftalık Yeni Zelanda soyundan beyaz erkek tavşanlar kullanılarak gerçekleştirildi. İmmünizasyona başlamadan önce tavşanlar ayrı ayrı kafeslere konularak bir hafta süre ile buldukları ortama adaptasyonları sağlandı. Her bakteri suşu için dört tavşan seçilerek tavşanların immünizasyon öncesi kanları alındı. Serumları ayrı ayrı immünize edileceği ve çapraz reaksiyon verdiği bakterilerle aglutinasyon verip vermediği ayrı ayrı lam aglutinasyon yöntemiyle test edildi. Aglutinasyon vermedikleri anlaşılınca antijen enjeksiyonlarına geçildi. Bu arada immünizasyon sırasında tavşanların kiloları tartılarak kilosunda azalma olanların ek yeşillik ve vitamin takviyesi ile kilo kayıpları önleildi.

Bakteri stoğunda -70°C'de bulunan bakteriler, immünizasyon gününden birkaç gün önce %5 defibrine koyun kanlı agara pasajlanarak buradan alınan bir koloni, "brain-heart infusion broth"a aktarıldı ve 24 saat sürekli çalkalanmak suretiyle homojen üremeleri sağlandı. Oluşan bakteri süspansiyonu iki saat 100°C'de kaynatılarak ısı ile öldürüldü ve H antijenleri tahrip edildi. Ardından santrifüjlenip üç kez serum fizyolojik (SF) ile yıkandıktan sonra 2 x 10⁹/mL (≅ Mac Farland 7) yoğunlukta olacak şekilde (Densimat, bioMerieux, France) SF ile bakteri süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonu, her defasında taze hazırlanmak koşulu ile tavşanların kulak "vena marginalis"inden dörder gün ara ile 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 4.0 ve 4.0 cc olacak şekilde enjekte edildi. Son enjeksiyondan bir hafta sonra kontrol serumları alınarak kompleman inaktivasyonu için 56°C'de 30 dakika inkübe edildi. Antikor titreleri, üç Mac Farland bulanıklığında antijen solüsyonu kullanılarak dilüsyon yöntemine göre tespit edildi. *V. cholerae* O1 serogrubu için 1/2560 ve

V. cholerae O139 için 1/320 titrasyonlara ulaşan tavşanların kanları alınarak ileri absorpsiyon işlemlerine tabi tutuldu^[12,13].

V. cholerae O1 ve O139 serogrubu ile çapraz reaksiyon veren diğer cinslerden absorpsiyon için kullanılacak olan bakterilerden özellikle *Salmonella* grup N izolatu ile *S. flexneri* ve *S. boydii* seçildi. Absorpsiyon işlemi için kullanılan ve "brain-heart infusion broth"da çoğaltılan bakteriler, Roux şişelerine alınarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Diğer cinsler farklı morfoloji, hareket ve biyoşimik özellikleri nedeniyle absorpsiyona dahil edilmedi. İnkübasyon sonrası SF ile sulandırılan bakteriler, bir saat 100°C'de kaynatıldıktan sonra santrifüjlenerek üç kez SF ile yıkandı. Daha önceden hazırlanarak 1/5 oranında sulandırılan antiseruma eklenen bakteri paketi (1 mL antiserum için yaklaşık 1 g bakteri) hiç partikül kalmayacak şekilde vortekslenildikten sonra bir saat 42°C'de inkübe edildi ve bir gece 4°C'de buzdolabında bekletildi. Ertesi gün 6000 rpm'de bir saat santrifüj edilen karışım, 0.45 µm'lik filtreden (Costar, Bodenheim, Germany) geçirildikten sonra taze pasajlanmış *V. cholerae* O1 Ogawa, Inaba serotipleri ile *V. cholerae* O139 serogrubu, çapraz reaksiyon verdikleri bakterilerle ayrı ayrı lam aglutinasyon yöntemi ile karşılaştırıldı. Absorpsiyonun tamamlanmaması durumunda her bir bakteri grubu için kullanılan bakteri paketi yeniden SF ile sulandırıldı ve 100°C'de bir saat kaynatıldıktan sonra santrifüjlenerek yukarıdaki işlemler absorpsiyon işlemi tamamlanmaya kadar sürdürüldü^[9]. Absorbe edilmiş antiserumlara koruyucu olarak %0.01 oranında tiomersalat eklendi.

LPS izolasyonu için; 569B, AH170 ve MO45 suşları "brain-heart infusion broth"da üretildi. Saflığı kontrol edildikten sonra bakteriler ayrı ayrı 25'er adet Roux şişesine ekilerek sekiz saat inkübasyondan sonra stasyonier fazdaki bakteriler SF ile toplandı^[14]. Toplanan bakteriler santrifüjlendikten sonra inaktivasyon için 65°C'de bir saat %1.5'lik formalinde (v/v) bekletildi^[15]. Santrifüjlendikten ve üç kez SF ile yıkandıktan sonra bakteri paketi, aseton ile muamele edildi ve 37°C'de bir gece kurumaya bırakıldı. Kuruyan bakteriler steril havanda dövülerek toz haline getirildi^[16]. Toz haline gelen bakteri LPS'lerinin izolasyonu için, Westphal'in fenol su yöntemi kullanıldı^[7]. Daha sonra üç gün distile suya karşı 4°C'de diyalize edilen materyal, modifiye Lowry metoduna göre protein içeriği açısından kontrol edildi ve protein içermediği anlaşılınca liyofilizasyona tabi tutuldu^[17]. Liyofilizasyondan sonra konsantrasyonu %3

olacak şekilde distile su içinde süspanse edilen ham ürün, 105.000 g'de her defasında dört saat olmak üzere üç kez ultrasantrifügasyona (Centrikon T-1190, Kontron Instruments SPA) tabi tutuldu. Pellet, 500 µL distile su ile ekstrakte edilerek liyofilize edildi. Bir kısmı ile materyalin periodat duyarlı karbonhidrat parçaları içerdiğini gösteren "periodic acid Schiff (PAS)" boyama ve endotoksin varlığını kanıtlamak amacı ile "Limulus amoebocyte lysate (LAL)" testi yapıldı^[7,15,18]. Pürifiye edilen her üç bakteriye ait LPS liyofilizatları, düz tabanlı, orta derecede bağlama kapasitesine sahip ELISA pleytlerine (Costar, Bodeheim, Germany) kaplanarak çalışıldı.

BULGULAR

Tavşanların immünizasyon tamamlandığında verdikleri titrasyonlar, Tablo 1'de gösterilmiştir. *Salmonella* grup N izolatu, *S. flexneri* ve *S. boydii* bakterilerinin absorpsiyonu için beşer adet Roux şişesinden elde edilmiş bakteri paketi yeterli olmuştur. Absorpsiyon sırasında gerek O1 serogrubunun her iki serotipi (Ogawa ve Inaba) gerekse O139 serogrubu

ile çapraz reaksiyon veren ve koloni morfolojisi olarak bu bakterilerden ayrılamayan R tip *V. cholerae* suşu (CA385) her üç bakteri için ayrı ayrı sekizer Roux şişesine ekilmiş, çapraz reaksiyon ancak iki kez absorbe edilmekle ortadan kaldırılabilmıştır^[19]. Ogawa suşunun absorbe edilmesinde sekiz, Inaba suşun da ise beş adet Roux şişesinden elde edilmiş bakteri paketi kullanılmıştır. *V. cholerae* O139 serogrubunun çapraz reaksiyon verdiği diğer serogruplar olan *V. cholerae* O22 ve O155 suşlarının absorpsiyonu için de beşer adet Roux şişesinden elde edilen bakteri paketi kullanılmış, işlem iki kez tekrar edilmiştir. LPS izolasyonu için 25'er adet Roux şişesinde üretilen bakterilerin toz ağırlıkları AH170 için 1.946 g, 569B için 1.538 g ve MO45 için 1.894 g olarak belirlenmiştir. Westphal'in fenol su yöntemi-ne göre LPS izolasyonları ise AH170 için 44 mg, 569B için 33 mg ve MO45 için 42 mg olarak gerçekleşmiştir. Her üç bakteriye ait diyalizatların, 1 mg/mL BSA içeren pozitif ve distile su içeren negatif kontrollerin spektrofotometrede 640 nm'de verdikleri absorpsanslar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. İmmünizasyon sonrası elde edilen antiserum titreleri

Tavşan no	Verilen bakteri	İmmünizasyon sayısı	Titrasyon
1	AH170	3	3. aşıdan sonra ex.
2	AH170	7	1/5120
3	AH170	6	1/10240
4	AH170	6	6. aşıdan sonra ex.
5	569B	6	1/10240
6	569B	7	1/5120
7	569B	4	4. aşıdan sonra ex.
8	569B	2	2. aşıdan sonra ex.
9	MO45	6	1/1280
10	MO45	5	5. aşıdan sonra ex.
11	MO45	3	3. aşıdan sonra ex.
12	MO45	7	1/640

Tablo 2. Diyalizatların negatif ve pozitif kontrollere göre 640 nm'de absorpsans değerleri

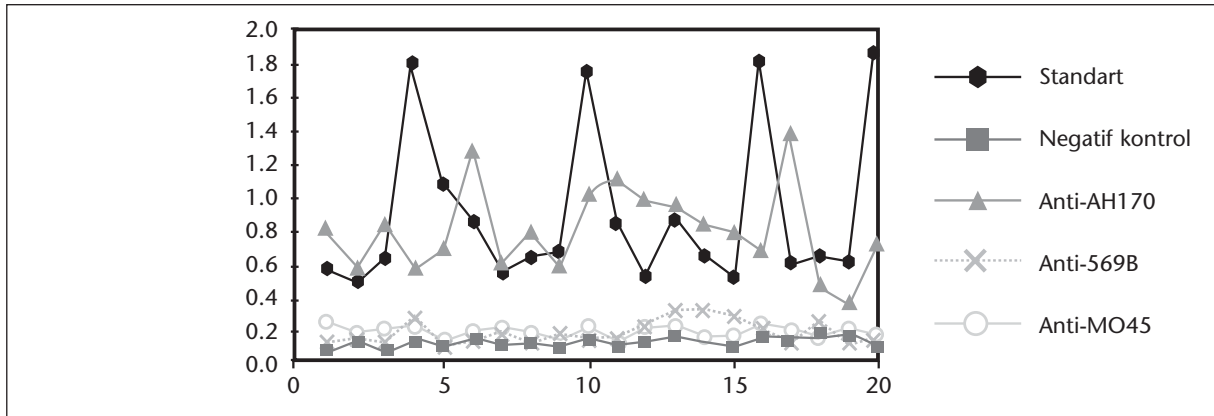
• Distile su	0.070	• MO45 (50 µL)	0.073
• BSA (50 µL)	0.404	• MO45 (100 µL)	0.073
• BSA (100 µL)	0.809	• AH170 (50 µL)	0.072
• 569B (50 µL)	0.071	• AH170 (100 µL)	0.073
• 569B (100 µL)	0.071		

AH170, 569B ve MO45 suşlarının LPS'lerinin kaplandığı kuyucuklarda standart, üretilen ve çapraz reaksiyon verdikleri antiserumlar ve negatif kontrol ile 450 nm'de verdikleri absorbanslar açısından değerlendirilerek istatistiksel analizleri SPSS programında Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Üretilen antiOgawa monovalan antiserumu ile negatif kontrol, antiInaba ve antiO139 antiserumları ile elde edilen absorbanslar açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p= 0.0001$), standart antiserum ile üretilen antiserum arasında ise böyle bir farkın olmadığı belirlenmiştir ($p= 0.7788$). Aynı durum üretilen antiInaba ve antiO139 antiserumlarının negatif kontroller ve kendi içinde karşılaştırıldıkları antiserumlarla sözkonusu iken ($p= 0.0001$), antiInaba standart antiserum ile üretilen antiInaba antiserum arasındaki istatistiksel anlamlılık $p= 0.2315$, antiO139 standart antiserumu ile üretilen antiO139 antiserumu arasındaki istatistiksel anlamlılık ise $p= 0.1826$ olarak bulunmuştur (Grafik 1, 2, 3).

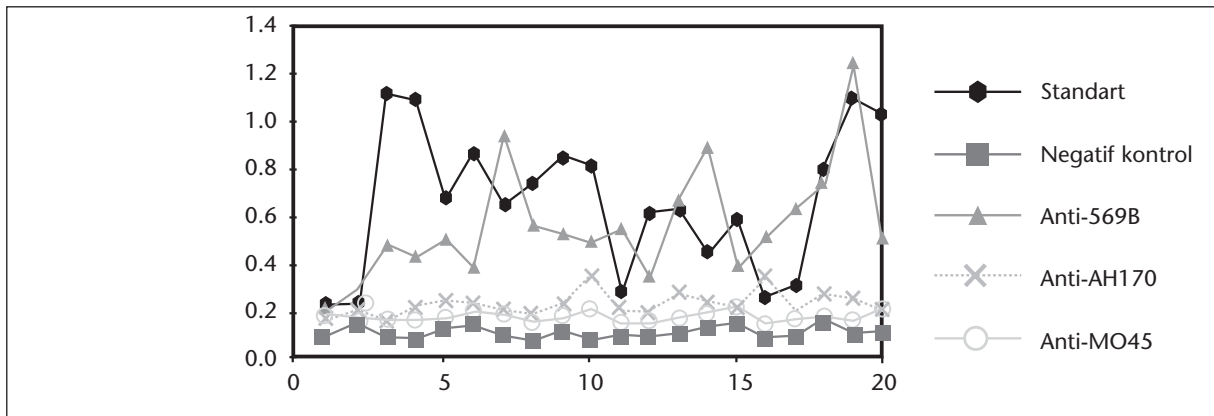
TARTIŞMA

V. cholerae O1 ve O139 serogrubunun serolojik tanısında aglutinasyon reaksiyonları çok sık olarak kullanılmaktadır. Polivalan O1 antiserumları ile serolojik identifikasyonu yapılan O1 serogrubu bakterilerin, monovalan Ogawa ve Inaba antiserumları ile karşılaştırılarak serotip düzeyinde tanımlanması gereklidir. Kay ve arkadaşları, polivalan O1 antiserumları ile şüpheli ya da zayıf aglutinasyon veren, ancak Ogawa ya da Inaba monovalan antiserumları ile aglutinasyon vermeyen izolatların O1 serogrubu olmayacağını söylemektedirler^[20]. Bu nedenle serolojik identifikasyonda monovalan antiserumların kullanılması bir zorunluluktur.

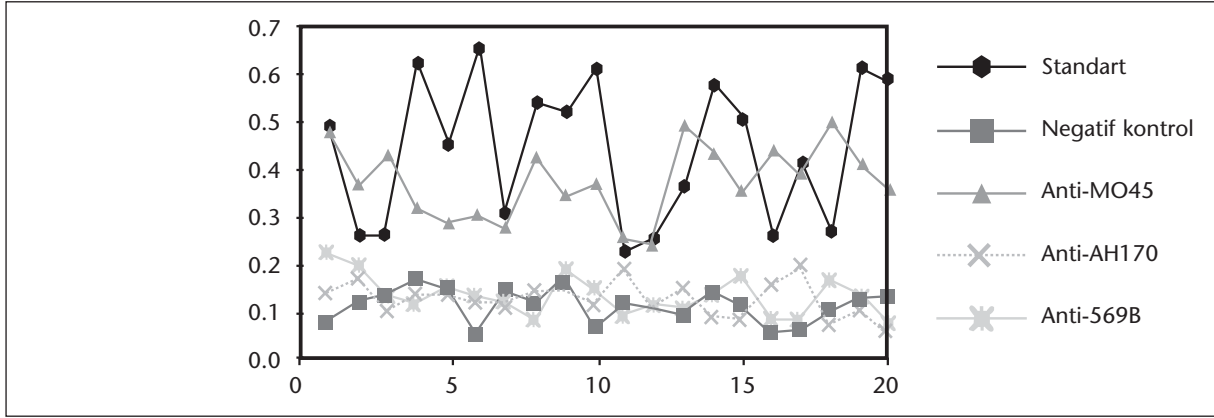
Kolera immünoloji çalışmalarında ve antiserum üretilmesinde tavşanlar çok yaygın olarak kullanılmakta, insanlarda olduğu gibi tavşanlarda da gastrointestinal yolla alınan yeterli sayıda bakteri ishale neden olmaktadır^[15,21]. Bu nedenle hem lam ve tüp aglutinasyon hem de *Vibrio* LPS'lerinin kaplı olduğu ELISA çalışmamızda tavşanlardan elde ettiğimiz antiserumları kullandık.



Grafik 1. Ogawa LPS kaplı kuyucuklarda absorbans değerleri



Grafik 2. Inaba LPS kaplı kuyucuklarda absorbans değerleri



Grafik 3. O139 LPS kaplı kuyucuklarda absorbands değerleri

Sakazaki ve arkadaşları, *V. cholerae* O1 serogrubu için böyle bir aglutinin antiserum hazırlanmasında 1/1000'lik bir titre elde edilmesini yeterli görmüştür^[22]. Biz de çalışmamızda aglutinin antiserum eldesinde, özellikle *V. cholerae*'nin kendi serogrupları ile olan absorbsiyon işlemlerini gözönüne alarak çok yüksek titreler elde etmeyi amaçlamadığımızdan Freund adjuvantı kullanmadık.

Çiftçiöğlü ve arkadaşlarının tavşanlarda *Escherichia coli* ile yaptıkları immünizasyon çalışmalarında sekonder yanıtın ilk enjeksiyondan 10 gün sonra olduğu, antikor titresinin yükselmeye başladığı, ortalama 20. günde antikor titresinin 1/10240 düzeyine geldiği, halbuki *S. aureus* ile aynı dozlarda (Mac Farland 2) ve sayıda yapılan enjeksiyonlarda titrenin aynı süre sonunda 1/1280 düzeyinde kaldığı belirtilmektedir^[23]. Aynı çalışmada titrasyon oranları açısından da tavşanlar arası anlamlı farklılıklar olduğu vurgulanmaktadır. Biz de yaptığımız immünizasyon çalışmasında 24-28. günlerde *V. cholerae* O1 serogrubu için 1/5120-1/10240 oranlarında titre elde ederken, *V. cholerae* O139 serogrubu için 1/640-1/1280 oranında titre elde ettik. Elde ettiğimiz titrasyon oranları aynı bakteri için tavşandan tavşana farklılıklar göstermektedir. Bunun nedeni araştırmacılar tarafından, kullanılan deney hayvanlarının gen yapısının farklılığına bağlanmakta, konağın içinde bulunduğu hormonal evrenin de titrasyonların farklı olmasında etkili olduğu belirtilmektedir^[24].

Antiserum üretiminde ölü veya canlı bakteriler kullanılabilir. Çalışmamızda ölü bakterilerin kullanılmasını tercih ettik. Kabir, tavşanlar üzerinde yaptığı bir araştırmada ölü veya canlı *V. cholerae* ile yapılan bağışıklama çalışmalarında tavşanların immün yanıtları arasında farklılık bulunduğunu, özellikle ölü preparasyonlar uygulandığında hem bakteri

LPS'sine hem de major dış membran proteinine karşı olan immün yanıtın daha güçlü olduğunu vurgulamaktadır^[15]. Bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak yazara göre büyük olasılıkla bu durum canlı olarak verilen bakterinin hem in vivo ortamın getirdiği birçok faktörün etkisi altında çoğalması, hem de makrofajlarca işlenmesi sırasında ölü olarak verilen bakteriye göre antijenik yapısının değişmesinden kaynaklanmaktadır.

Özellikle O1 serogrubuna ait monovalan antiserumların hazırlanması aşamasında inaba monovalan antiserumlarının absorbe edilmesi işleminde oldukça dikkatli olmak gerekmektedir. Sakazaki ve Donovan, pür inaba spesifik monovalan antiserumunun elde edilmesinin oldukça zor olduğunu, elde edilen polivalan antiseruma Ogawa bakteri paketinin fazla miktarda eklenmesinin yavaş ve zayıf bir aglutinasyona neden olabileceğini belirtmektedir^[22]. Biz de bu işlem sırasında böyle bir duruma neden olmamak için önce beş adet Roux şişesinden elde ettiğimiz bakteri paketi ile absorbsiyon yaptık. Oluşan çapraz reaksiyonun şiddetine göre kademeli olarak bakteri paket miktarını artırarak absorbsiyon işlemini tamamladık. Tersine Ogawa monovalan antiserumunun elde edilmesinde daha rahat davrandık. Absorbsiyon sırasında önce sekiz adet Roux şişesinden elde ettiğimiz bakteri paketini, bu yeterli olmayınca aynı bakteri paketini 100°C'de kaynatıp içinde bulunan aglutininleri harap ederek birkaç kez daha kullandık. Sonuçta bu şekilde üç kez yapılan absorbsiyondan sonra istediğimiz kalitede saflaştırılmış monovalan antiserum elde ettik.

O serogrupları dikkate alınmaksızın tüm *V. cholerae* suşlarında R (core veya rough) antijenleri serolojik olarak identiktir. Koloni yapısı olarak bu R form bakteriler S kolonilerden ayıramamakta, ancak kendi antiserumları ve %0.1'lik acriflavine ile verdikleri

aglutinasyonlar yolu ile belirlenebilmektedirler^[22]. Bu nedenle elde edilen polivalan antiserumların mutlaka *V. cholerae* R kültürleri ile absorbe edilmesi gerekir. Biz de çalışmamızda R antijenlerinin absorbe edilmesi için uygun bir suş olan CA385'i kullandık.

V. cholerae O139 serogrubu, özellikle O22 ve O155 serogrupları ile çapraz reaksiyon vermektedir^[25]. Diğer serogruplarda olduğu gibi O139 serogrubunda da R antijenlerinin absorbe edilmesi gerekir. Albert ve arkadaşları, O139 serogrubunun bir *A. trota* suşu ile ortak antijenler taşıdığını, ancak serolojik olarak identik olmadığını, adı geçen bakteriler arasındaki ilişkinin daha önce O22 ve O155 serogrupları ile *V. cholerae* O139 serogrubu arasındaki ilişkiye benzer bir şekilde olduğunu ifade etmektedirler^[9]. Aynı araştırmacılar *A. trota* suşunun izole edilmesi durumunda bunun biyokimyasal olarak gösterilmesinin serolojik olarak ortaya çıkabilecek bir karışıklığı önleyebileceğini, bu nedenle bu bakteri ile herhangi bir absorpsiyon çalışmasına gerek olmadığını belirtmektedirler. Biz de O139 antiserumunu çapraz reaksiyonları elimine edebilmek amacıyla absorbe ederken serogrup O22 (169-68), O155 ve CA385 suşlarını kullandık.

Çalışmamızda O1 serogrubu *V. cholerae* bakterilerinin diğer cinslerle olan antijenik yakınlığını da gözardı etmedik. Bu bakımdan absorpsiyon sırasında ayrıca hem *Salmonella* grup N bakterilerden bir suşu, hem de *S. flexneri* ve *S. boydii* izolatlarını kullandık. Winkle ve arkadaşları, *Salmonella* cinsi bakterilerle gelişen besin zehirlenmelerine bağlı gastroenteritlerin kolera ile benzer belirtiler verebileceğini belirtmekte, bunların laktoz negatif ve hareketli olmaları nedeni ile mutlaka absorpsiyon işlemlerine dahil edilmesi gerektiğini vurgulamaktadırlar^[26]. Aynı araştırmacılar *Shigella* cinsi ile olan aglutinasyonu 1/10-1/20 olarak ifade etmektedirler. Bütün bu absorpsiyon işlemlerine rağmen kesin identifikasyonda bakterinin izole edilerek morfoloji, hareket ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesinin birinci derecede önem taşıdığını, elde edilen antiserumlarla serolojik identifikasyonun tamamlayıcı bir unsur olduğunu unutmamak gerekir. Aynı zamanda çalışmamızda kullandığımız suşların spesifik O antiserumları ile aglutinasyonu önleyen M antijeni taşımaması nedeniyle bir sorunla karşılaşmadık.

Günümüzde bakterilerin LPS'lerinin izolasyonunda en sık kullanılan yöntem Westphal'in fenol su yöntemi^[27]. Kabir, bu yöntemle göre elde edilen pürifiye *V. cholerae* LPS'sinin belirlenebilecek miktarda protein ve nükleik asit içermediğini vurgula-

maktadır^[7]. Aynı araştırmacı tüm hücre *V. cholerae* ekstraktlarına karşı elde edilen antiserumların, immünodiffüzyonda pürifiye LPS'ye karşı tek bir bant oluşturmasına karşın tüm hücre ekstraktına karşı birçok bant oluşturduğunu, bunun; LPS'nin pür olduğunu ve diğer bakteri komponentlerini içermediğini gösterdiğini belirtmektedir. Mayer ve arkadaşları ise ekstrakte edilen materyalde çok az miktarda protein bulunabileceğini belirtmektedir^[27]. Sengupta ve arkadaşları, bu protein kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için proteolitik bir enzim kullanılmasını önermektedir^[28]. Biz de çalışmamız sırasında elde ettiğimiz ilk LPS ekstraktlarında Lowry metoduna göre minimal düzeyde bir protein kontaminasyonu saptadık. Bu kontaminasyonu ancak "proteinaz K" kullanılarak ortadan kaldırdık.

Lowry yönteminde test edilebilen minimum protein miktarı 2 µg/200 µL ile 5 µg/1 mL arasındadır. İkiyüz µL materyal içindeki 50 µg proteinin 640 nm'deki optik dansitesi yaklaşık 0.4 olmaktadır^[17]. Biz çalışmamızda kör dikkate alındığında Inaba LPS'si için 0.001, Ogawa LPS'si için 0.002-0.003 ve O139 LPS'si için ise 0.003 absorbans elde ederek ELISA'ya olan protein etkisini minimuma indirdik.

ELISA, özellikle immünize edilmiş deney hayvanlarının antikor yanıtının test edilmesinde de kullanılabilen sade bir ölçüm yöntemidir^[29]. Birçok çalışmada 450 nm'de 0.2'nin üzerindeki absorbanslar pozitif sonuç olarak değerlendirilirken, bunun altındaki absorbanslar negatif olarak kabul edilmiştir^[6,14,30,31]. Biz de yaptığımız ELISA çalışmasında her üç bakteriye ait LPS'lerin kaplı olduğu kuyucuklarda, bakterilerin kendi antiserumları ile anlamlı olarak yüksek absorbanslar verdiğini, absorbans değerlerinin 0.2'nin çok üzerinde olduğunu, aksine diğer antiserumlar ve SF ile istatistiksel olarak anlamlı negatif değerler verdiğini (0.2'nin altında) belirledik.

Sonuç olarak, *V. cholerae*'nin serolojik identifikasyonunda kullanılacak monovalan O1 ve O139 antiserumları üreterek pratik sahada kullanıma hazır hale getirdik. Elde ettiğimiz monovalan antiserumları, daha önce değişik tarihlerde izole edilen 11 adet *V. cholerae* O1 biyotip El Tor serotip Ogawa ve dört adet *V. cholerae* O1 biyotip El Tor serotip Inaba izolatu üzerinde denedik. Yaptığımız lam aglutinasyon deneylerinde tüm izolatlarda herhangi bir çapraz reaksiyona rastlamaksızın antiserumları başarı ile kullandık.

KAYNAKLAR

1. Morris JG. Non-O Group 1 *Vibrio cholerae*: A look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiologic Reviews* 1990;12:179-91.
2. Greenough WB. *Vibrio cholerae* and Cholera. In: Mandell G, Bennett J, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed, New York: Churchill Livingstone, 1995:1934-44.
3. Nair BG, Ramamurthy T, Bhattacharya K. Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *JID* 1994;169:1029-34.
4. Cholera Working Group, International centre for diarrhoeal diseases research, Bangladesh. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *V. cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* 1993;342:387-90.
5. Joklik WK, Wilett HP, Amos DB, Wilfert CM. *Vibrionaceae*. *Zinsser Microbiology*. 19th ed, Appleton and Lange, 1988:480-6.
6. Kabir S. Composition and immunochemical properties of the cell surface proteins of *Vibrio cholerae*. *J Gen Microbiol* 1986;132:2235-42.
7. Kabir S. Characterization of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* 395 (Ogawa). *Infect Immun* 1982;38:1263-72.
8. Koneman WE, Allen DS, Janda MW, Schreckenberger CP, Winn CW. The families vibrionaceae and "Aeromonadaceae". *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed, Washington: JB Lippincott Company, 1992:258.
9. Albert JM, Ansaruzzaman M, Shimada T, et al. Characterization of *Aeromonas trota* strains that crossed-react with *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J Clin Microbiol* 1995;33:3119-23.
10. Adams BL, Henk MC, Siebeling RJ. Detection of *Vibrio cholerae* with monoclonal antibodies specific for serovar O1 lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1988;26:1801-9.
11. Doğancı L, Gün H, Baysallar M, Albay A, Çınar E, Haznedarođlu T. Short-term quinolones for successful eradication of multiply resistant *Vibrio cholerae* in adult patients. *Scand J Infect Dis* 1995;27:425-6.
12. Fournier JM (izni ile). *Mektupla Elde Edilen Görüşleri*. Institute Pasteur, 1996.
13. Takeda Y (izni ile). *Mektupla Elde Edilen Görüşleri*. Research Institute, International Medical Center of Japan, 1996.
14. Kabir S. Immunochemical properties of the major outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1983;39:452-5.
15. Kabir S. Antigenic analysis of *Vibrio cholerae* O1 by crossed immunoelectrophoresis. *Zbl Bakt Hyg* 1989; A270:361-72.
16. Peker İ. *Salmonella* Grubu Bakteriler İçin Aglutinan Serum Hazırlama Yöntemleri. *Uzmanlık Tezi*, Ankara: GATA Mikrobiyoloji Enstitüsü, 1979:1-50.
17. Johnstone A, Thorpe R. *Basic Techniques. Immunochimistry in Practice*. 2nd ed, Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1987:1-35.
18. Prophet E, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Periodic Acid Schiff (PAS) Prosedure. Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1992:151-2.
19. Mundy LS, Shanholtzer JC, Willard KE, Peterson LR. An evaluation of three commercial fecal transport systems for the recovery of enteric pathogens. *Am J Clin Pathol* 1991;96:364-7.
20. Kay BA, Bopp AC, Wells GJ. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O (eds). *Vibrio cholerae* and Cholera: Molecular to Global Perspectives. Washington DC: ASM Press, 1994:3-25.
21. Özbütev T. *Salmonella* Polivalan Aglutinan Serum Üretimi. *Uzmanlık Tezi*, Ankara: GATA Sağlık Araştırma ve Biyoloji Enstitüsü, 1972:1-36.
22. Sakazaki R, Donovan TJ. Serology and epidemiology of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Methods in Microbiology* 1984;16:271-89.
23. Çiftçiođlu N, Ciciođlu R. Tavşanlarda primer ve sekonder immün yanıtın aglutinasyon, indirekt hemaglutinasyon ve immünodiffüzyon yöntemleriyle araştırılması. *İnfek Derg* 1990;4:317-26.
24. Çiftçiođlu N, Ciciođlu R. Yeni bir immünizasyon şeması ile tavşanlardan yüksek titrede antiserum elde edilmesi. *İnfek Derg* 1989;3:237-44.
25. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, et al. Two strains of *Vibrio cholerae* Non-O1 possessing somatic (O) antigen factors in common with *V. cholerae* serogroup O139 synonym "Bengal". *Curr Microbiol* 1995;29:331-3.
26. Winkle S, Refai M, Rohde R. On the antigenic relationship of *Vibrio cholerae* to Enterobacteriaceae. *Ann Inst Pasteur* 1972;123:775-81.
27. Mayer H, Tharanathan RN, Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Methods in Microbiology* 1985;18:157-207.
28. Sengupta DK, Datta-Roy K, Banerjee K, Ghose AC. Identification of some antigenically related outer membrane proteins of strains of *Vibrio cholerae* O1 and Non-O1 serovars involved in intestinal adhesion and the protective role of antibodies to them. *J Med Microbiol* 1989;29:33-9.
29. Johnstone A, Thorpe R. *Basic Techniques. Immunochimistry in Practice*. 2nd ed, Great Britain: Blackwell Scientific Publications, 1987:241-60.
30. Cryz SJ, Furer E, Germanier R. Effect of chemical and heat inactivation on the antigenity and immunogenicity of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1982;38:21-6.
31. Kabir S. The serological properties of the cell surface proteins of *Vibrio cholerae*. *J Gen Microbiol* 1983; 129:2199-206.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Levent DOĞANCI

Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve

Askeri Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve

Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

06018, Etlük - ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 10.02.2000

Kabul Tarihi: 10.04.2000