Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Protective Efficacy of a Divalent Candidate Vaccine Consisting of Type A Flagellin and Pilin Against Dermal *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Murine Burn Model

Bahador Behrouz, Farhad Bonakdar Hashemi*

Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

Article Information

Article history:
Received: 2018/03/06
Accepted: 2018/09/05
Available online: 2018/11/23

Article Subject:
Medical Bacteriology

IJMM 2018; 12(4): 248-259

Corresponding author:

Farhad Bonakdar Hashemi
Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email:
farhadb.hashemi@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes serious infections and high mortality among burn patients. The aim of this study is to evaluate the protective effects of a candidate divalent vaccine containing type A flagellin and pilin of *P. aeruginosa* in a burn wound mouse model.

Materials and Methods: Recombinant flagellin A and pilin proteins were generated by expressing *fliC and pilA* genes (cloned in pET-28a and pET-22b vectors, respectively) in *E. coli* BL-21. Groups of mice were immunized by injection of 10 µg of either flagellin A and pilin, or flagellin A, or pilin. Specific IgG titer was measured by ELISA. The functional activity of antibodies was evaluated by opsonophagocytosis assay. The protective effects of the vaccine were evaluated by measuring mortality and bacterial load in mice.

Results: Immunization with flagellin A and pilin mixture significantly increased the specific IgG antibody titer as well as opsonophagocytosis compared to monovalent antigens (P<0.05). Immunization with flagellin A and pilin mixture significantly reduced the bacterial load, and increased the survival of mice challenged with *P. aeruginosa*, as compared to the monovalent antigens (P<0.05).

Conclusions: Immunization with flagellin A and pilin mixture provides effective protection against *P. aeruginosa* wound infection in burned mice. Reduced bacterial load, and high survival rates among immunized mice suggest that flagellin A and pilin candidate vaccine shows therapeutic potential against *P. aeruginosa* infections among burn patients.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Flagellin a, Pilin, Opsonophagocytosis

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Bonakdar Hashemi F, Behrouz B. Protective Efficacy of a Divalent Candidate Vaccine Consisting of Type A Flagellin and Pilin Against Dermal Pseudomonas aeruginosa Infection in a Murine Burn Model. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (4):248-259

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۴ – مهر-آبان ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

بررسی اثر حفاظت‌بخش کاندیدای واکسن دوجزئی شامل فلاژلین تیپ A و پیلین در برابر عفونت جلدی *سودوموناس آئروژینوزا* در مدل موش سوخته

بهادر بهروز، فرهاد بنکدارهاشمی*

گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۵

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۹/۰۲

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM1397;12(4): 248-259

نویسندهٔ مسئول:

فرهاد بنکدارهاشمی

گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

پست الکترونیک:

farhadb.hashemi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا عامل بیماری‌زای فرصت‌طلبی است که باعث عفونت‌های جدی و مرگ‌ومیر زیاد در بیماران سوختگی می‌شود. هدف این مطالعه، ارزیابی اثرات حفاظت‌بخش کاندیدای واکسن دوگانه شامل فلاژلین *تیپ A* و پیلین سودوموناس آئروژینوزا در مدل موشی عفونت زخم سوختگی است.

مواد و روش کار: ژن‌های *فلاژلین A* (*fliC*) و *پیلین* (*pilA*) به‌ترتیب در وکتورهای pET-28a و pET-22b کلون‌شده و پروتئین‌های نوترکیب در باکتری *E. coli BL-21* بیان گردیدند. موش‌ها با تزریق زیر جلدی ۱۰ میکروگرم از مخلوط *فلاژلین A* و پیلین، یا *فلاژلین A*، یا پیلین ایمن شدند. تیتر IgG اختصاصی به‌وسیلهٔ الیزای غیرمستقیم و فعالیت عملکردی آنتی‌بادی‌ها با تست *اپسونوفاگوسیتوز* بررسی شد. در پایان میزان مرگ‌ومیر و بار باکتریایی در موش‌ها سنجیده شد.

یافته‌ها: ایمن‌سازی با مخلوط *فلاژلین A* و پیلین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تیتر آنتی‌بادی IgG اختصاصی و *اپسونوفاگوسیتوز* نسبت به آنتی‌ژن‌های تک‌جزئی شد ($P<۰/۰۵$). همچنین ایمن‌سازی با مخلوط فلاژلین *A* و پیلین باعث کاهش بار باکتریایی و افزایش بقای موش‌های در چالش با سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌ژن‌های تک‌جزئی شد ($P <۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: ایمن‌سازی با مخلوط فلاژلین *A* و پیلین باعث حفاظت موش‌های سوخته در برابر عفونت زخم سودوموناس آئروژینوزا می‌شود. کاهش بار باکتری و افزایش بقای موش ایمن‌شده نشان می‌دهد مخلوط فلاژلین *A* و پیلین پتانسیل کاربرد درمانی را علیه سودوموناس آئروژینوزا در بیماران سوخته دارد.

کلمات کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، فلاژلین *A*، پیلین، *اوپسونوفاگوسیتوز*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سوختگی نوعی جراحت پوست یا غشاهای مخاطی است که محیطی مطلوب و غنی از پروتئین‌های بافت نکروز برای کلونیزاسیون و تکثیر میکروارگانسیم‌ها فراهم کرده و بیماران را مستعد ابتلا به عفونت‌های باکتریایی می‌کند (۱). با توجه به نتایج حاصل از مطالعات اپیدمیولوژی کشورهای مختلف، سودوموناس آئروژینوزا عامل عفونت‌زای عمدهٔ زخم‌های سوختگی، و یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در بیماران دچار سوختگی است. لذا در سراسر جهان چالشی جدی برای سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی در هنگام سوختگی به شمار می‌رود (۲،۳). سویه‌های مقاوم به چند دارو سودوموناس آئروژینوزا توانایی قابل‌ملاحظه‌ای برای زنده ماندن در محیط‌های مختلف بیمارستانی دارد و موجب شیوع عفونت‌های بیمارستانی در بخش سوختگی بیمارستان‌های سراسر جهان می‌شود که عمدتا با ایجاد مقاومت در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل ضدمیکروبی و بیان فاکتورهای ویرولانس همراه است. اخیرا در سازمان بهداشت جهانی *سودوموناس آئروژینوزا* در گروه باکتری‌های پاتوژنیک با اهمیت "بحرانی" قرار گرفته است که بیشترین خطر را برای سلامت انسان دارند (۲،۳). سویه‌های مقاوم به چند داروی *سودوموناس آئروژینوزا* به‌سرعت می‌تواند به بافت‌های عمیق‌تر انتشار یابد و باعث عفونت‌های سیستمیک و سپسیس با مرگ‌ومیر زیاد شود. درمان عفونت‌های زخم سوختگی بسیار دشوار است (۲). ناکارآمدی درمان‌های مرسوم در اثر مقاومت میکروبی سودوموناس آئروژینوز همراه با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

مرگ‌ومیر بالای عفونت‌های زخم سوختگی، ضرورت طراحی و به‌کارگیری روش‌های درمانی مؤثر و کنترل عفونت‌های ناشی از این باکتری را نشان می‌دهد. از آنجا که زخم‌های سوختگی می‌تواند با سویه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا* آلوده شود، کاندید واکسن مؤثر باید حاوی آنتی‌ژن‌هایی باشد که در میان همهٔ سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* بیان شده و نقش مهمی در بیماری‌زایی باکتری ایفا کند.

سودوموناس آئروژینوزا، پیلی قطبی تولید می‌کند که به‌عنوان پیلی تیپ IV یا پیلی ان-متیل فنیل آلانین طبقه‌بندی شده است (۴). فیلامنت پیلی از هزاران زیرواحد مونومریک پروتئین PilA یا پیلین تشکیل شده است که با ژن *pilA* کد می شود (۴،۵). *PilA* پیلینی با طول کوتاه (۵۰ تا ۶۰ اسید آمینه) است که تغییرات کمی در میان سویه‌های مختلف نشان می‌دهد و حفاظت‌شده است (۶،۷). پیلی تیپ IV سودوموناس آئروژینوزا مسئول اتصال اولیه، حرکت لغزشی، تشکیل میکروکلنی، تشکیل بیوفیلم و ترشح اگروتوکسین S است (۸،۹). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است آنتی‌بادی‌های ضدپیلین می‌تواند از اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال جلوگیری کند (۱۰،۱۱).

سودوموناس آئروژینوزا یک فلاژل قطبی دارد که نقش مهمی در اتصال، کلونیزاسیون و تهاجم ایفا می‌کند (۱۲). پروتئین فلاژلین زیرواحد اصلی تشکیل‌دهندهٔ فلاژل است و با ژن *fliC* کد می‌شود (۱۳). مطالعات موشی نشان داده است آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد*فلاژلین* از طریق افزایش اپسونوفاگوسیتوزیس و مهار حرکت از عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* ممانعت به عمل می آورد (۱۴). همچنین *فلاژلین* با تحریک سیستم ایمنی ذاتی از طریق Toll-like receptor 5 (TLR5) می‌تواند به‌عنوان ادجوانت یا پروتئین حامل در مطالعات واکسن به کار گرفته شود (۱۵).

اگرچه اثرات حفاظتی کاندیدهای واکسن تک‌جزئی فلاژلین تیپ *A* (۱۶) یا پیلین (۱۷) در برابر عفونت زخم سوختگی *سودوموناس آئروژینوزا* محافظت محدودی را نشان داده است؛ اما محافظت از طریق ساختار دوجزئی حاوی توالی کامل مخلوط پروتئینی فلاژلین *A* و پیلین در برابر عفونت *سودوموناس آئروژینوزا* هنوز بررسی نشده است. لذا هدف این مطالعه استفاده از مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان کاندید واکسن علیه عفونت‌های سوختگی ناشی از این باکتری است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

سویه‌های استاندارد PAK (ATCC 53308) و سویهٔ بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از عفونت زخم سوختگی (مقاوم به آنتی بیوتیک‌های پراسیلین، ایمی‌پنم، سفوتاکسیم، جنتامایسین، سفتازیدیم، آزترونام و سیپروفلوکساسین) از مرکز تحقیقات سوختگی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه و پس از کشت و احیاء با روش‌های متداول بیوشیمیایی تعین هویت شد (۱۸). حضور و بیان ژن‌های فلاژلین تیپ A و پیلین در سویهٔ بالینی سودوموناس آئروژینوزا و با روش‌های PCR و ایمونوبلات تأیید شد (۱۹،۲۰).

بیان و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب

بیان و خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب فلاژلین تیپ A و پیلین طبق مطالعات گذشته انجام شد و با روش وسترن بلات به تأیید رسید (۱۹،۲۰). ژن‌های فلاژلین A (*fliC*) و *پیلین* (*pilA*) به‌ترتیب در وکتورهای pET-28a و pET-22b کلون شده و با روش شوک حرارتی به سویهٔ بیانی *E. coli BL-21* ترانسفورم شد. اندازهٔ ژن فلاژلین تیپ A (*fliC*) و پیلین (*pilA*) به‌ترتیب ۱۴۸۹ و ۴۶۲ جفت باز است. مطالعات گذشته نشان داد پروتئین فلاژلین تیپ A و پیلین تولیدی به شکل انکلوژن بادی در داخل سیتوپلاسم باکتری تجمع می‌یابند و بهترین شرایطی که به بیان بالای پروتئین منجر می‌شود، القای ۴ ساعته با IPTG ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس است. پروتئین نوترکیب فلاژلین تیپ A و پیلین با روش دناتوراسیون و سپس شیب کاهشی اوره روی ستون Ni-NTA و به شکل محلول در بافر حاوی ایمیدازول از ستون جدا می‌شوند. مطالعات گذشته نشان داده است وزن ملکولی پروتئین فلاژلین تیپ A و پیلین به‌ترتیب ۴۵ کیلودالتون و ۱۹ کیلودالتون است (۱۹،۲۰).

ایمن‌سازی فعال

جهت ارزیابی پاسخ‌های سیستم ایمنی به مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین، فلاژلین A، و پیلین از موش‌های BALB/c-۸ ۶ هفته‌ای (تهیه‌شده از انستیتو پاستور کرج) استفاده شد. موش‌ها در ۹ گروه ۱۲ تایی در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند و در روزهای ۰، ۱۴ و ۲۸ با تزریق زیر جلدی آنتی‌ژن ایمن شدند. گروه‌های موشی در جدول ۱ مشخص شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

مقدار تجویز ایمونوژن براساس مطالعات گذشته تعیین شد (۱۹،۲۰). دو هفته پس از آخرین واکسن، از موش‌ها خونگیری گوشهٔ چشم (سینوس رتروارربیتال) به عمل آمد. سرم‌ها جدا و برای سنجش عیار IgG اختصاصی، ایزوتیپ‌های IgG1 و IgG2a و آزمون اپسونوفاگوسیتوز در منفی ۲۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند.

جدول ۱. گروه‌های موش

گروه	ایمونوژن	چالش
۱	مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین (۵ میکروگرم از هر کدام)	سویهٔ استاندارد PAK
۲	مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین (۵ میکروگرم از هر کدام)	سویهٔ بالینی
۳	فلاژلین تیپ A (۱۰ میکروگرم)	سویهٔ استاندارد PAK
۴	فلاژلین تیپ A (۱۰ میکروگرم)	سویهٔ بالینی
۵	پیلین (۱۰ میکروگرم)	سویهٔ استاندارد PAK
۶	پیلین (۱۰ میکروگرم)	سویهٔ بالینی
۷	PBS	سویهٔ استاندارد PAK
۸	PBS	سویهٔ بالینی
۹	گروه شاهد (گروه کنترل سوختگی)	بدون چالش

وسترن بلات (Western Blot)

هدف از آزمایش وسترن بلات بررسی واکنش‌پذیری و اختصاصیت سرم‌های گروه‌های موشی ایمن‌شده با مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین، یا فلاژلین A، یا پیلین با پروتئین طبیعی (native) بیان‌شده در سطح باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* بود. سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط مطلوب، از ژل SDS-PAGE و با استفاده از سیستم انتقال wet (Bio-Rad) به کاغذ پلی وینیلیدین دی فلورید (Polyvinylidene Fluoride: PVDF) منتقل شد. مسدودسازی غشای PVDF با محلول آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) به مدت ۱ ساعت انجام شد. در مرحلهٔ بعد غشای PVDF با سرم‌های گروه‌های موشی به مدت ۲ ساعت مجاور شدند. شستشو با بافر تریس نمکی محتوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ (Tris-Buffered Saline with Tween: TBS-T) انجام شد. سپس غشا با آنتی‌بادی ثانویه Goat anti-Mouse IgG, کنژوگه با پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰۰ برای مدت ۲ ساعت مجاور شد. غشا پس از شستشو با محلول سوبسترای DAB (3,3'-diaminobenzidine) مجاور شده و بلافاصله باندهای ظاهرشده روی غشا ثبت شد.

سنجش سطح IgG اختصاصی و زیرکلاس‌ها

میزان IgG اختصاصی و زیرکلاس در سرم موشی علیه سویه‌های استاندارد PAK و سویهٔ بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* به‌روش الیزای غیرمستقیم طبق مطالعات گذشته اندازه‌گیری شد (۲۱،۲۲). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از تعداد تقریبی ۱×۱۰^{۸} *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی در phosphate buffered saline (PBS) (pH ۷/۴) به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای (SPL, Korea) اضافه، و به مدت یک شب در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. پس از ۳ بار شستشو با بافر PBS-T (بافر PBS محتوی ۰/۰۵٪ Tween -۲۰)، با PBS-T محتوی ۵ درصد Bovine serum albumin (BSA) به مدت ۲ ساعت در ۳۷ °C بلوکه شد و به دنبال چند بار شستشو با PBS-T، از سرم‌های موشی رقت ۱:۱۰۰۰ تهیه شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه، و به مدت ۲ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از ۴ بار شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی خرگوشی کونژوگه با پراکسیداز (rabbit anti-mouse IgG, Sigma, USA) با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به هر چاهک اضافه و ۹۰ دقیقه در ۳۷ °C انکوبه شد. به دنبال چند مرحله شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف رنگزای TMB/H_2O_2 (Razi institute, Iran) به هر چاهک اضافه، فعالیت آنزیمی به کمک اسید سولفوریک ۱ نرمال (Merck, Germany) متوقف و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر (Pharmacia, France) قرائت شد. سنجش سطح ایزوتیپ‌های IgG1 و IgG2a مطابق روش بالا صورت گرفت با این تفاوت که از آنتی‌بادی ضد IgG1 (Goat anti-mouse IgG1, Sigma) و Goat anti-mouse IgG2a) (IgG2a, Sigma با رقت ۱:۱۰۰۰ به هر چاهک اضافه و یک ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. به دنبال چند مرحله شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی خرگوشی کونژوگه با پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰۰ اضافه شد. پس از ۵ مرحله شستشو معرف رنگزای

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

TMB به هر چاهک اضافه شده و پس از ۳۰ دقیقه واکنش آنزیمی با اسید سولفوریک ۱ نرمال متوقف و جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

آزمون اپسونوفاگوسیتوز

۱۰۰ میکرولیتر از سرم گروه‌های موشی ایمن یا کنترل حرارت‌دیده (۵۶ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه) همراه با ۱۰۰ میکرولیتر ماکروفاژهای موشی با تعداد تقریبی cfu /ml ۱×۱۰^{۷} به اضافهٔ ۱۰۰ میکرولیتر سرم ۴ درصد بچه خرگوش به‌عنوان منبع کمپلمان و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با تعداد تقریبی cfu /ml ۲×۱۰^{۷} در میکروتیوب‌های استریل مخلوط شدند. تیوب‌های کنترل هر بار فاقد یکی از اجزاء سرم، کمپلمان و یا نوتروفیل بودند و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه می‌شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند، سپس ۵۰ میکرولیتر از هر میکروتیوب برداشته شد و پس از رقیق‌سازی در PBS استریل، روی محیط مکانیکی آگار کشت داده می‌شد. پس از انکوباسیون به مدت ۱۶ ساعت پلیت‌ها در ۳۷ درجهٔ سلسیوس، تعداد کلنی‌های رشدکرده شمرده شد، و درصد کشته‌شدن باکتری‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه و با یکدیگر مقایسه شد. (۲۳).

$$\text{درصد باکتری کشته‌شده} = [1 - \frac{\text{CFU از حاصل سرم ایمن در زمان 90 دقیقه}}{\text{CFU از حاصل سرم غیر ایمن در زمان 90 دقیقه}}] \times 100$$

بررسی میزان بار میکروبی و چالش در مدل موش سوخته

ابتدا موش‌ها ایمن‌شده و کنترل با استفاده از مخلوط کتامین هیدروکلراید (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۲۰mg/kg) در سالین به شکل داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس پشت موش‌ها تراشیده شد و با قرار دادن یک ورق آلومینیومی در ابعاد ۱/۵×۱ اینچ در ناحیهٔ عاری از مو با ۱/۵ سی‌سی اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۰ ثانیه سوزانده شدند. بدین ترتیب ۱۲ تا ۱۵ درصد پشت موش دچار سوختگی درجهٔ ۳ می‌شود. بلافاصله ۰/۵ سی‌سی سالین به شکل داخل صفاقی، برای جبران آب ازدست‌رفته تزریق شد. از استامینوفن (۰/۲۵mg/ml) به عنوان مسکن بعد از سوختگی استفاده شد. موش‌های سوزانده‌شده با این روش به‌شدت به عفونت‌های کشندهٔ *سودوموناس آئروژینوزا* حساس بوده و حداقل دوز کشندگی در این حالت CFU $۱۰^{۲}$ است (۲۴). به گروه‌های موشی، با CFU $۳\text{-}۵\times۱۰^{۲}$ با سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به صورت تزریق جلدی در محل سوختگی، چالش وارد شد و ۲۴ ساعت بعد از چالش، ۴ سر موش از هر گروه قطع نخاع شدند. تحت شرایط استریل از هر سر موش نمونهٔ خون و پوست سوخته به اندازهٔ ۱/۵×۱/۵ سانتی‌متر نمونه تهیه شد و بعد از باز کردن شکم حیوان، نمونهٔ طحال و کبد جدا شد و داخل پلیت قرار گرفت. سپس یک میلی‌لیتر نرمال سالین استریل به پلیت‌ها اضافه، و نمونه‌های بافتی با ته سرنگ له شد. سپس از مایع درون پلیت رقت‌های سریالی تهیه و به مدت سه روز روی محیط سودموناس آگار در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. سپس تعداد کلونی‌های رشدکرده در هر گروه با توجه به رقت آن محاسبه شد. میزان بقا و مرگ‌ومیر در تمام گروه‌های موشی به مدت یک هفته پیگیری و ثبت شد.

یافته‌ها

واکنش‌پذیری و اختصاصیت سرم‌های گروه‌های موشی

واکنش‌پذیری و ویژگی سرم گروه‌های موشی واکسینه نسبت به آنتی‌ژن هدف با استفاده از ایمونوبلاتینگ سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. همان‌گونه که در شکل ۱-الف نشان داده شده است، سرم‌های موشی ایمن‌شده با مخلوط *فلاژلین تیپ A* و پیلین با پروتئین‌های ۴۵ و ۱۹ کیلودالتونی موجود در لیزات سلولی که به‌ترتیب بیانگر ترتیب فلاژلین تیپ A و پیلین هستند، واکنش دادند. سرم‌های موش‌های واکسینه‌شده با فلاژلین تیپ A یا پیلین به‌ترتیب با پروتئین ۴۵ کیلودالتونی یا ۱۹ کیلودالتونی موجود در لیزات سلولی واکنش نشان دادند که به‌ترتیب بیانگر فلاژلین تیپ A یا پیلین بودند (شکل ۱-ب و ج).

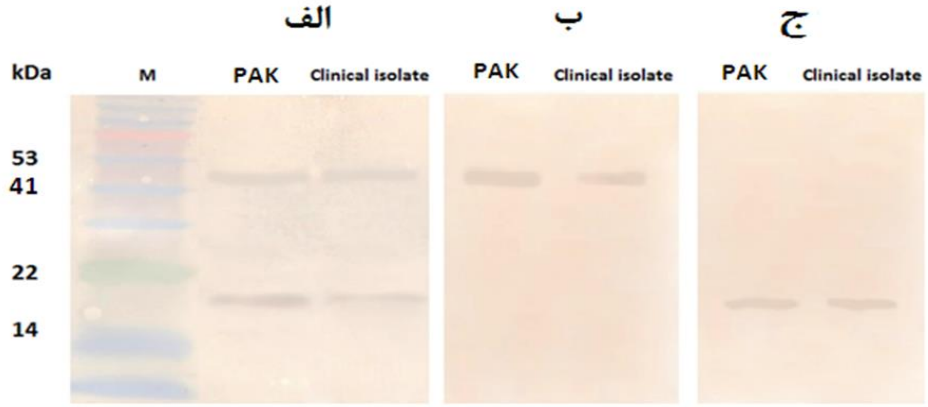
نتایج بررسی پاسخ‌های آنتی‌بادی

همان طور که در نمودار ۱-الف تا و آورده شده است، نتایج آزمون الیزا نشان داد ایمن‌سازی با مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین در مقایسه با گروه‌های واکسینه‌شده با فلاژلین تیپ A یا پیلین تک‌جزئی به‌طور معنی‌داری به افزایش میزان آنتی‌بادی IgG اختصاصی، IgG1 و IgG2a منجر شد (P <۰/۰۱). همچنین ایمن‌سازی با فلاژلین تیپ A یا پیلین تک‌جزئی می‌تواند به‌طور معنی‌داری باعث افزایش آنتی‌بادی IgG اختصاصی، IgG1 و IgG2a نسبت به گروه کنترل (PBS) شود (P <۰/۰۱) (نمودار ۱-الف تا و).

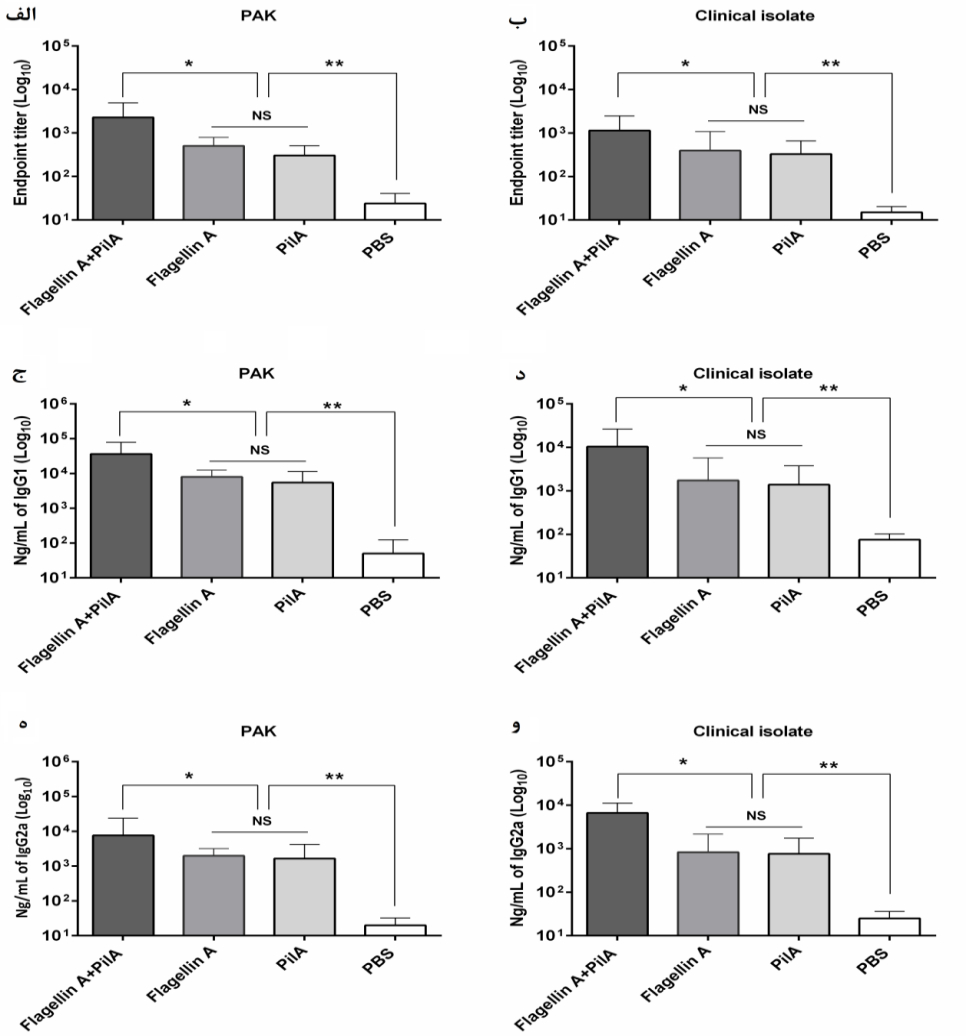
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019



شکل ۱. ایمونوبلاتینگ سرم‌های گروه‌های موشی ایمن‌شده با مخلوط پروتئین‌های نوترکیب فلاژلین تیپ A و پیلین (الف)، پروتئین نوترکیب فلاژلین تیپ A (ب) و پروتئین نوترکیب پیلین (ج) با سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی سودوموناس آئروژینوزا را نشان می‌دهد. M: مارکر پروتئینی.



نمودار ۱. الف تا و. میزان IgG اختصاصی سرمی (الف تا ب)، IgG1 (ج تا د) و IgG2a (ه تا و) سرمی تولیدشده در گروه‌های آزمون در میان‌کنش با سویه‌های PAK و بالینی، *= P <۰/۰۵ و **= P <۰/۰۱. NS: نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنادار از نظر آماری است.

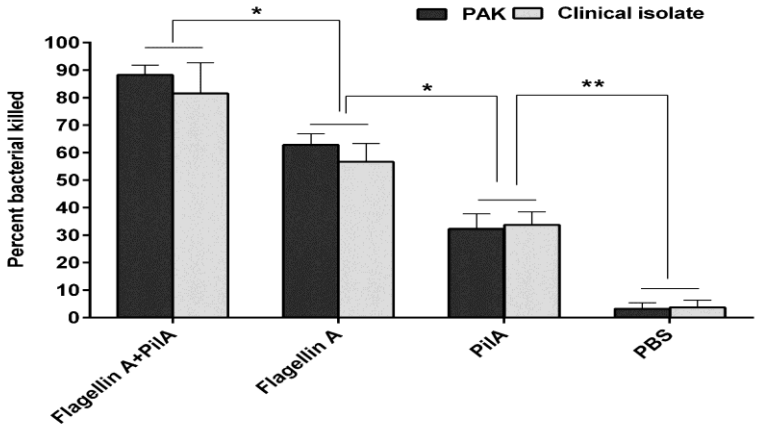
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

ارزیابی فعالیت اپسونینی

به منظور بررسی توانایی القای فاگوسیتوز با سرم‌های گروه‌های موشی، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با آنتی‌بادی‌های ضدمخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین، یا فلاژلین A، یا پیلین، ماکروفاژ موشی و کمپلمان خرگوش انکوبه شدند. همان طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، سرم‌های موشی ایمن‌شده با مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین در رقت ۱:۱۰، مرگ وابسته به اپسونوفاگوسیتوز سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی را به‌ترتیب به میزان ۸۸/۳۱ و ۸۱/۵۶ درصد افزایش داد که اختلاف آن نسبت به سرم‌های موشی ایمن‌شده با فلاژلین تیپ A یا پیلین معنی‌دار است (P <۰/۰۵). سرم‌های موشی ایمن‌شده با فلاژلین تیپ A مرگ وابسته به اپسونوفاگوسیتوز سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی را به ترتیب به میزان ۶۲/۸۵ و ۵۶/۶۵ درصد افزایش داد که اختلاف آن نسبت به سرم‌های موشی ایمن‌شده با پیلین و گروه‌های کنترل PBS معنی‌دار است (P <۰/۰۵). سرم‌های موشی ایمن‌شده با پیلین، مرگ وابسته به اپسونوفاگوسیتوز سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی را به‌ترتیب به میزان ۳۲/۲۹ و ۳۳/۸۱ درصد افزایش داد که اختلاف آن نسبت به گروه‌های کنترل PBS معنی‌دار است (P <۰/۰۱).



نمودار ۲. مقایسهٔ فعالیت اپسونوفاگوسیتوزی سرم‌های گروه‌های موشی در برابر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا. *= P <۰/۰۵ و **= P <۰/۰۱. NS: نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنادار از نظر آماری است.

نتایج حاصل از میزان بار باکتری موش‌های در چالش با سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا

برای بررسی اثرات حفاظتی مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین، یا فلاژلین A، یا پیلین از مدل موش سوخته در چالش با ۵۰ درصد دوز کشندهٔ سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد. کاهش میزان بار باکتریایی در کبد و طحال گروه‌های موشی ایمن‌شده با مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین در مقایسه با گروه‌های ایمن شده با فلاژلین تیپ A یا پیلین از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۳- الف و ب) (P<۰/۰۵). همچنین ایمن‌سازی با فلاژلین تیپ A به‌طور معنی‌داری باعث کاهش بار باکتریایی در کبد و طحال در مقایسه با گروه‌های موشی ایمن‌شده با پیلین شد (نمودار ۳- الف و ب) (P <۰/۰۵). ایمن‌سازی با پیلین نیز به‌طور معنی‌داری باعث کاهش بار باکتریایی در کبد و طحال در مقایسه با گروه‌های کنترل PBS شد (P <۰/۰۵). اختلاف میزان بار باکتریایی در پوست گروه‌های موشی ایمن‌شده و غیرایمن، از نظر آماری معنی‌دار نبود (P >۰/۰۵) (نمودار ۳ ج).

محافظت در برابر سویهٔ کشنده

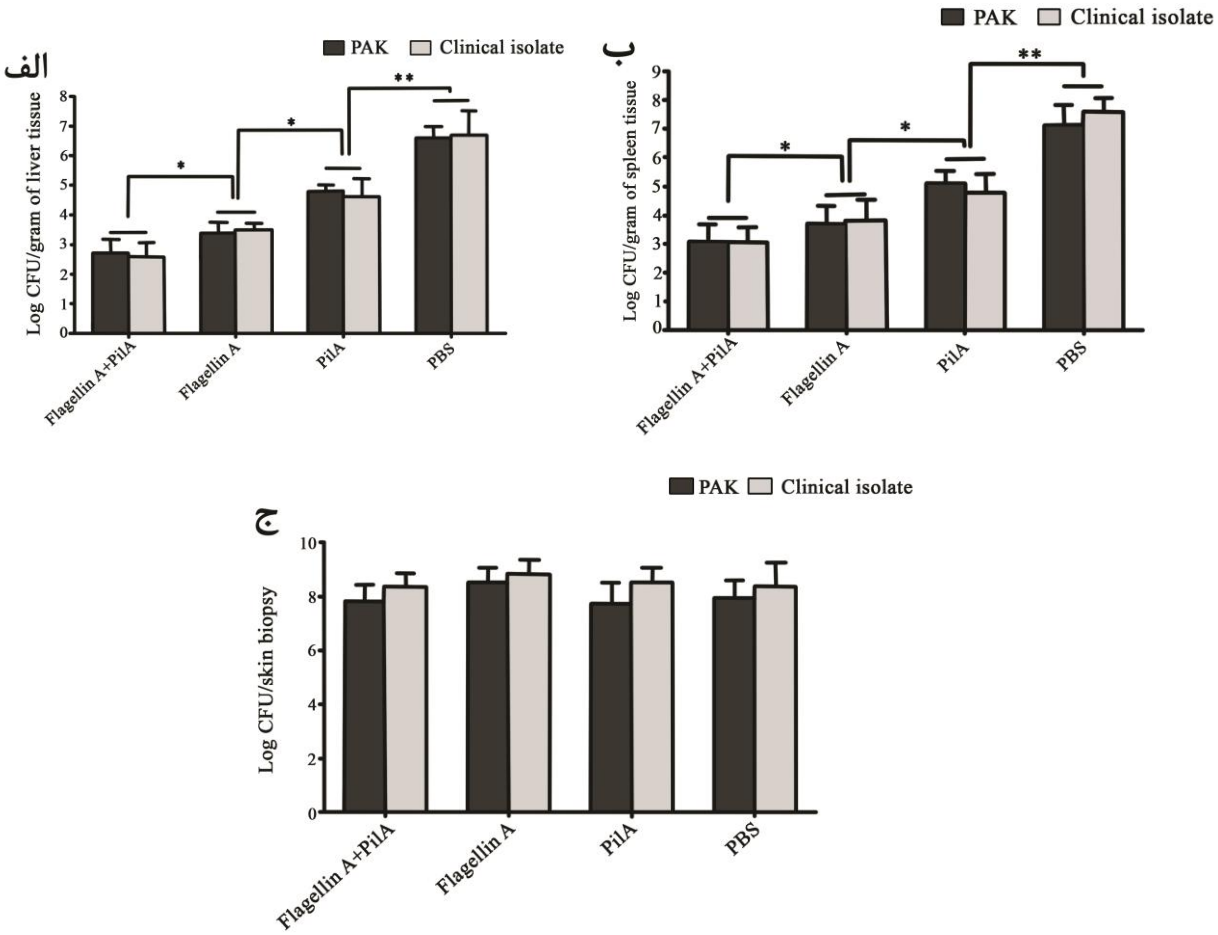
میزان مرگ‌ومیر موش‌ها به مدت ۷ روز مداوم بعد از چالش بررسی شد (نمودار ۴-الف و ب). تمام موش‌هایی که PBS دریافت کرده بودند (کنترل)، در طول ۴ روز پس از سوختگی و چالش مردند. در مقایسه با گروه‌های کنترل، میزان بقای موش‌های واکسینه‌شده با مخلوط پروتئینی فلاژلین A و پیلین در چالش با سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا PAK و سویهٔ بالینی به‌ترتیب ۱۰۰ و ۹۱/۶۶ درصد تعیین شد (P <۰/۰۱). ایمن‌سازی با فلاژلین تیپ A بقای موش‌های در چالش را با سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی به‌ترتیب ۸۳/۶۶ و ۷۵ درصد افزایش داد (P <۰/۰۱). در مقایسه با گروه‌های کنترل، بقای گروه‌های موشی ایمن‌شده با پیلین در

www.SID.ir

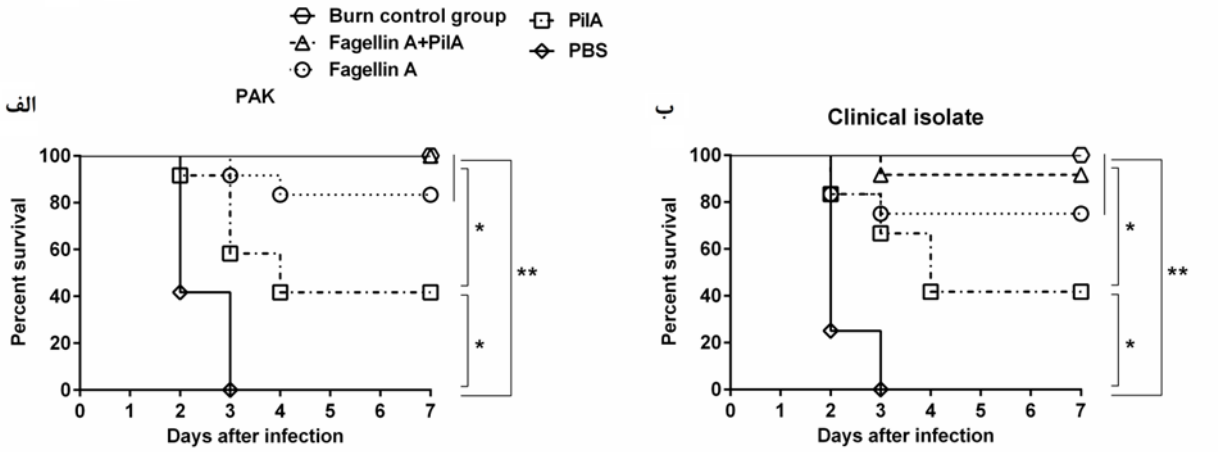
Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

چالش با سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی به میزان ۴۱/۶۶ درصد (برای هر دو سویه) افزایش یافت (P <۰/۰۵) (نمودار ۴-الف و ب).



شکل ۳. مقایسهٔ میزان بار باکتری در کبد (الف)، طحال (ب) و پوست (ج) گروه‌های مختلف موشی. داده‌ها از میانگین ۴ سر موش از هرگروه به دست آمده است. *= P <۰/۰۵ و **= P <۰/۰۱. NS: نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنادار از نظر آماری است.



شکل ۴. مقایسهٔ میزان مرگ‌ومیر گروه‌های مختلف موشی در چالش با سویهٔ PAK (الف) و سویهٔ بالینی (ب). نمودار میزان بقای گروه‌های موشی در روز ۷ را نشان می‌دهد. *= P <۰/۰۵ و **= P <۰/۰۱.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه کارایی یک کاندید واکسن جدید دوجزئی در برابر عفونت زخم سوختگی سودوموناس آئروژینوزا را در مدل موشی بررسی کرده است. سودوموناس آئروژینوزا به علت ظهور مقاومت ضدمیکروبی و تولید فاکتورهای بیماری‌زایی متنوع، باعث عفونت‌های تهدیدکنندهٔ حیات می‌شود (۲۵). توانایی قابل‌توجه این باکتری در زنده ماندن و گسترش در بیماران سوخته، همراه با محدود بودن عوامل ضدمیکروبی مؤثر، نیاز جدی به ارائهٔ روش‌های جایگزین را برای درمان عفونت‌های سودموناسی، از جمله واکسن نشان می‌دهد (۲۶). تاکنون، آنتی‌ژن‌های متعددی به‌عنوان کاندید واکسن در برابر این پاتوژن قرار گرفته است (۲۷،۲۸). در میان فاکتورهای ویرولانس سودوموناس آئروژینوزا، پروتئین‌های فلاژلین تیپ A و پیلین بیشترین پتانسیل را برای ایجاد یک کاندید واکسن حفاظتی دارند؛ چراکه علاوه بر ایجاد پاسخ ایمنی؛ تقریبا در تمام سویه‌های بیماری‌زا بیان این دو پروتئین برای کلونیزاسیون و زنده‌ماندن سودوموناس آئروژینوزا در میزبان ضروری است (۲۹،۳۰). در این مطالعه، برای نشان دادن کارآیی کاندیدای واکسن دوجزئی فلاژلین تیپ A و پیلین، از مدل موشی زخم سوختگی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا استفاده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد ایمن‌سازی فعال با مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین باعث افزایش سطح IgG اختصاصی، IgG1 و IgG2a سرمی شده که بیانگر پاسخ ایمنی هومورال است. علاوه بر این، ایمن‌سازی فعال با مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین موجب تولید آنتی‌بادی‌های اپسونیزه‌کننده می‌شود که نقش مهمی در ایجاد حفاظت علیه عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا دارد (۳۳،۳۴). اخیرا، کارایی کاندیدهای واکسن تک‌جزئی پروتئین‌های فلاژلین تیپ A و یا پیلین در برابر عفونت زخم سوختگی سودوموناس آئروژینوزا نشان داده شده است (۳۱،۳۲). در این مطالعه اضافه‌شدن پروتئین پیلین به فلاژلین تیپ A، فعالیت‌های سینرژیسم آنتی‌بادی‌ها را از طریق مرگ وابسته به اپسونوفاگوسیتوز افزایش داده و حفاظت مؤثر را در برابر سویهٔ هترولوگ سودوموناس آئروژینوزا فراهم می‌کند. همچنین مشخص شد، آنتی‌بادی‌های IgG تولیدشده علیه مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین با هر دو سودوموناس آئروژینوزا واکنش داده و نشان می‌دهد ایمونوژن دوجزئی می‌تواند توانایی بالقوه‌ای در ایجاد پاسخ‌های حفاظتی در برابر سویه‌های مختلف بالینی سودوموناس آئروژینوزا فراهم کند که البته به بررسی و کار میدانی در مطالعات بعدی نیاز دارد. مدتی طولانی است که فلاژلین به‌عنوان عامل مؤثر ایمونولوژیک در ایجاد مصونیت در عفونت سودوموناس آئروژینوزا کاربرد دارد (۳۴). اثرات فلاژلین به‌عنوان ادجوانت و یا پروتئین حامل در پیشگیری و درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا شناخته شده است (۳۳،۳۵). حضور فلاژلین تیپ A در ایمونوژن دوجزئی نه تنها در ایجاد پاسخ‌های آنتی‌بادی اپسونینی نقش دارد، بلکه پیشنهاد می‌شود به‌عنوان ادجوانت عمل کرده و باعث افزایش کارایی ایمونوژن شود (۳۳).

برای مشخص کردن نوع پاسخ ایمنی به فلاژلین A و پیلین، پاسخ‌های IgG1 و IgG2a سرمی بررسی شد. IgG2a از طریق زیرمجموعهٔ Th1 و طی تمایز از سلول‌های CD4+ T تولید می‌شود (۳۲). Th2 پاسخ سلول‌های B را آغاز می‌کند، اما برخی از کلون‌های Th1 می‌تواند سلول‌های B را برای ترشح IgG2a فعال کند (۳۲). مطالعات مختلف نشان می‌دهد، ایمنی هومورال و سلولی در پاسخ‌های حفاظتی نقش دارد، اما برای طراحی کاندید واکسن مؤثر علیه سودوموناس آئروژینوزا، باید نوع (حاد یا مزمن) و محل عفونت را در نظر گرفت (۲۷،۲۸). افزایش IgG1 و IgG2a در سرم‌های موشی بیانگر این است که ایمونوژن دوجزئی پاسخ ایمنی هومورال و سلول را ایجاد می‌کند. همچنین حضور فلاژلین در ایمونوژن دوگانه با افزایش نسبت IgG1 به IgG2a، به پاسخ ایمنی هومورال منجر می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده است سلول‌های CD4+ T تولیدکنندهٔ IL-4 همراه با آنتی‌بادی‌های اپسونینی، از عوامل مهم واکنش‌های ایمنی حفاظتی در برابر عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا است (۳۱،۳۲،۴۱).

افزایش تیتر IgG اگرچه معیار خوبی برای ارتقای ایمنی هومورال به شمار می‌رود؛ اما آنچه در دفاع و مقاومت اهمیت بیشتری دارد، کارایی و کیفیت این آنتی‌بادی‌ها در اپسونیزه کردن و افزایش مرگ فاگوسیتیک باکتری‌ها است (۳۴). نتایج ارزیابی تست اپسونوفاگوسیتوز نشان داد آنتی‌بادی‌های علیه فلاژلین A و پیلین، فعالیت اپسونیک معنی‌داری در مقایسه با آنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن‌های تک‌جزئی در برابر هر دو سویهٔ سودوموناس آئروژینوزا دارند. این نتیجه نشان می‌دهد آنتی‌بادی علیه مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین، دو فاکتور ویرولانس مهم سودوموناس آئروژینوزا را که نقش مهمی در کلونیزاسیون، تهاجم و انتشار سیستمیک باکتری در عفونت زخم سوختگی دارند، مهار می‌کنند (۳۱). فعالیت اسپونوفاگوسیتوز آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین نشان می‌دهد این آنتی‌بادی‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

توانایی پوشش و فاگسیتوز هر دو سویهٔ سودوموناس آئروژینوزا را دارند. فعالیت فاگسیتوز آنتی‌بادی علیه مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین، بیش از فعالیت سرم‌های گروه‌های موشی دریافت‌کنندهٔ آنتی‌ژن‌های تک‌جزئی است که فعالیت سینرژیک آنتی‌بادی علیه مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین را در برابر هر دو سویهٔ سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهد. مطالعات گذشته مشخص کرد گروه‌های موشی دریافت‌کنندهٔ فلاژلین A و B، مرگ اپسونوفاگوسیتوز هر دو سویهٔ سودوموناس آئروژینوزا را افزایش می دهند، اما میزان آن به‌طور معنی‌داری از فعالیت فاگسیتوز وابسته به آنتی‌بادی‌های علیه کاندید واکسن دوجزئی مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین کمتر است (۳۲). این نتایج نشان‌دهندهٔ این است که حضور پیلین در کاندید واکسن دوگانه باعث افزایش کارایی کاندید واکسن از طریق افزایش فعالیت اپسونوفاگوسیتوز می‌شود.

نتایج بررسی بار باکتریایی نشان داد مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین، انتشار سیستمیک سودوموناس آئروژینوزا را از محل عفونت به کبد و طحال مهار می‌کند. از طرفی برخلاف کاندیدهای واکسن تک‌جزئی، ایمن‌سازی با مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین، به‌طور معنی‌داری انتشار سیستمیک هر دو سویهٔ سودوموناس آئروژینوزا را از ریه به کبد مهار می‌کند (۳۱،۳۲). همچنین نشان داده شده است فلاژلین دوجزئی می‌تواند در برابر عفونت زخم سوختگی ناشی از سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا با ایجاد پاسخ هومورال باعث مرگ اپسونوفاگوسیتوز و بی‌حرکت‌شدن باکتری در محل زخم شود (۳۲). علت معنی‌دار نبودن میانگین بار باکتریایی گروه‌های مختلف موشی به احتمال زیاد می‌تواند با دسترسی‌نداشتن سیستم ایمنی به ناحیهٔ بافت سوخته ارتباط داشته باشد (۱۶). ایمن‌سازی با مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین، بار باکتریایی را از طریق تداخل در کلونیزاسیون در مراحل اولیهٔ عفونت کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین با مهار حرکت و افزایش مرگ اپسونوفاگوسیتوز می‌تواند از انتشار سیستمیک سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کرده و باعث افزایش بقا و ماندگاری موش‌ها در چالش با سودوموناس آئروژینوزا شود (۳۵،۴۲).

نتایج این تحقیق نشان داد مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین در مقایسه با کاندید واکسن‌های تک‌جزئی، پوشش حفاظتی جامع‌تری در برابر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا ارائه می‌دهد (۳۱،۳۲)؛ به‌طوری که ایمن‌سازی با مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین درصد بقای موش‌ها را در چالش با هر دو سویهٔ PAK و سویهٔ بالینی نسبت به دیگر گروه‌های تجربی افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از میزان بقا نیز نشان می‌دهد در موش‌های ایمن‌شده با مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین، آنتی‌بادی از طریق تداخل در مراحل اولیهٔ پاتوژنز باکتری در ریه از انتشار سیستمیک باکتری می‌کاهد. نکتهٔ قابل‌توجه این است که پاسخ‌های ایمنی موش‌های ایمن‌شده (نظیر آنتی‌بادی‌های اپسونیک) با کاهش بار باکتریایی و بقای موش‌ها مطابقت دارد. کارآمد بودن کاندیدای واکسن دوجزئی مخلوط فلاژلین تیپ A و پیلین در کاهش مرگ‌ومیر گروه‌های موشی در چالش با هر دو سویهٔ استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا، دلالت بر این می‌کند که این کاندیدای واکسن، پتانسیل ایجاد حفاظت وسیع‌الطیفی در برابر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا دارد که باید در مطالعات میدانی با سویه‌های بیشتری ارزیابی شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حمایت مالی این طرح را برعهده داشت تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. Clinical microbiology reviews. 2006;19(2):403-34. https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.403-434.2006 PMid:16614255 PMCid:PMC1471990
2. Naqvi SH. Pseudomonas aeruginosa burn wound infection in a dedicated paediatric burns unit. S Afr J Surg. 2013; 51(4): 151-2. https://doi.org/10.7196/sajs.1811
3. Gong YL, Yang ZC, Yin SP, Liu MX, Zhang C, Luo XQ, et al. [Analysis of the pathogenic characteristics of 162 severely burned patients with bloodstream infection]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi. 2016;32(9):529-35.
4. Pasloske BL, Finlay BB, Paranchych W. Cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin gene. FEBS Lett. 1985;183(2):408-12. https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80821-8

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

5. Finlay BB, Pasloske BL, Paranchych W. Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin gene in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1986;165(2):625-30. https://doi.org/10.1128/jb.165.2.625-630.1986 PMid:2867992 PMCid:PMC214465

6. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. Annu Rev Microbiol. 2002; 56: 289-314. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938 PMid:12142488

7. Watson AA, Mattick JS, Alm RA. Functional expression of heterologous type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene. 1996;175(1-2):143-50.

8. Hayashi N, Nishizawa H, Kitao S, Deguchi S, Nakamura T, Fujimoto A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* injects type III effector ExoS into epithelial cells through the function of type IV pili. FEBS Lett. 2015;589(8):890-6. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.02.031 PMid:25747138

9. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, et al. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol. 2008;10(9):2331-43. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x PMid:18485000

10. Woods DE, Straus DC, Johanson WG, Jr., Berry VK, Bass JA. Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian buccal epithelial cells. Infect Immun. 1980;29(3):1146-51.

11. Ramphal R, Sadoff JC, Pyle M, Silipigni JD. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium. Infect Immun. 1984;44(1):38-40.

12. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends Microbiol. 2004;12(11):509-17. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.09.002 PMid:15488392

13. Brimer CD, Montie TC. Cloning and comparison of fliC genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. J Bacteriol. 1998;180(12):3209-17.

14. Behrouz B, Amirmozafari N, Fizabadi MM, Khoramabadi N, Bahroudi M, Mahdavi M. Passive Immunity with Recombinant Anti-*Pseudomonas Aeruginosa* Type B Fagellin Antibody in a Burned Mouse Model. Arak University of Medical Sciences Journal. 2015;18(5):21-32.

15. Delavari S, Sohrabi M, Ardestani MS, Faezi S, Tebianian M, Taghizadeh M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adjuvant: superiority of a conjugated form of flagellin versus a mixture with a human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidate in the induction of immune responses. J Med Microbiol. 2015; 64(11): 1361-8. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000174 PMid:26404477

16. Behrouz B, Mahdavi M, Amirmozafari N, Fatemi MJ, Irajian G, Bahroudi M, et al. Immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* recombinant b-type fagellin as a vaccine candidate: Protective efficacy in a murine burn wound sepsis model. Burns. 2016;2. https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.03.015

17. Korpi F, Irajian G, Mahadavi M, Motamedifar M, Mousavi M, Laghaei P, et al. Active Immunization with Recombinant PilA protein Protects Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Mouse Burn Wound Model. J Microbiol Biotechnol. 2015;18.

18. Arai T, Enomoto S, Goto S. Determination of Pseudomonas aeruginosa by biochemical test methods. 3. Utilization of Tween 80 by *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn J Microbiol. 1970;14(4):285-90. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1970.tb00526.x PMid:4989464

19. Korpi F, Behrouz B, Motameifar M, Irajian G. Cloning, expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* pilin protein in the prokaryotic host. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2016;9(4):55-62.

www.SID.ir

Archive of SID

20. Goudarzi G, Sattari M, Roudkenar MH, Montajabi-Niyat M, Zavaran-Hosseini A, Mosavi-Hosseini K. Cloning, expression, purification, and characterization of recombinant flagellin isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. Biotechnol Lett. 2009;31(9):1353-60. https://doi.org/10.1007/s10529-009-0026-1
PMid:19466558

21. DiGiandomenico A, Rao J, Goldberg JB. Oral vaccination of BALB/c mice with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing *Pseudomonas aeruginosa* O antigen promotes increased survival in an acute fatal pneumonia model. Infect Immun. 2004;72(12):7012-21. https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.7012-7021.2004
PMid:15557624 PMCid:PMC529127

22. Behrouz B, Hashemi FB, Fatemi MJ, Naghavi S, Irajian G, Halabian R, et al. Immunization with Bivalent Flagellin Protects Mice against Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. J Immunol Res. 2017;2017:5689709. https://doi.org/10.1155/2017/5689709
PMid:29201922 PMCid:PMC5671732

23. Behrouz B, Amirmozafari N, Khoramabadi N, Bahroudi M, Legaee P, Mahdavi M. Cloning, Expression, and Purification of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin, and Characterization of the Elicited Anti-Flagellin Antibody. Iran Red Crescent Med J. 2016;18(6):e28271. https://doi.org/10.5812/ircmj.28271
PMid:27621933 PMCid:PMC5004508

24. Holder IA, Wheeler R, Montie TC. Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: animal protection studies. Infect Immun. 1982;35(1):276-80.

25. Trinh TD, Zasowski EJ, Claeys KC, Lagnf AM, Kidambi S, Davis SL, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* lower respiratory tract infections in the intensive care unit: Prevalence and risk factors. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;89(1):61-6. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.009
PMid:28716451

26. Maraolo AE, Cascella M, Corcione S, Cuomo A, Nappa S, Borgia G, et al. Management of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in the intensive care unit: state of the art. Expert Rev Anti Infect Ther. 2017;15(9):861-71. https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1367666
PMid:28803496

27. Johansen HK, Gotzsche PC. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2015;23(8):CD001399. https://doi.org/10.1002/14651858.CD001399.pub4

28. Priebe GP, Goldberg JB. Vaccines for *Pseudomonas aeruginosa*: a long and winding road. Expert Rev Vaccines. 2014;13(4):507-19. https://doi.org/10.1586/14760584.2014.890053
PMid:24575895 PMCid:PMC4521563

29. Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S, Ramphal R. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa burn wound infections. Infect Immun. 2005;73(7):4395-8. https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4395-4398.2005
PMid:15972536 PMCid:PMC1168557

30. Sato H, Okinaga K, Saito H. Selection of non-flagellated and non-piliated mutants from *Pseudomonas aeruginosa* strain TPB-1. Kitasato Arch Exp Med. 1987;60(3):79-86.

31. Korpi F, Hashemi FB, Irajian G, Fatemi MJ, Laghaei P, Behrouz B. Flagellin and pilin immunization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* protects mice in the burn wound sepsis model. Immunol Lett. 2016;176:8-17. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.04.002

32. Laghaei P, Hashemi FB, Irajian G, Korpi F, Amirmozafari N, Behrouz B. Immunogenicity and protective efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* type a and b flagellin vaccines in a burned mouse model. Mol Immunol. 2016; 74: 71-81. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.04.008
PMid:27152476

33. Weimer ET, Ervin SE, Wozniak DJ, Mizel SB. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against

www.SID.ir
Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 13:47 +0330 on Sunday March 10th 2019

nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2009;27(48):6762-9. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.08.080
PMid:19744586

34. Campodonico VL, Llosa NJ, Grout M, Doring G, Maira-Litran T, Pier GB. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. Infect Immun. 2010; 78(2): 746-55. https://doi.org/10.1128/IAI.00806-09
PMid:19995892 PMCid:PMC2812208

35. Ahmadi H, Behrouz B, Irajian G, Amirmozafari N, Naghavi S. Bivalent flagellin immunotherapy protects mice against *Pseudomonas aeruginosa* infections in both acute pneumonia and burn wound models. Biologicals. 2017; 46: 29-37. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.005
PMid:28065582

36. Berra L, Sampson J, Wiener-Kronish J. *Pseudomonas aeruginosa*: acute lung injury or ventilator-associated pneumonia? Minerva Anestesiol. 2010;76(10):824-32.

37. Worgall S, Kikuchi T, Singh R, Martushova K, Lande L, Crystal RG. Protection against pulmonary infection with Pseudomonas aeruginosa following immunization with *P. aeruginosa*-pulsed dendritic cells. Infect Immun. 2001; 69(7): 4521-7. https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4521-4527.2001
PMid:11401995 PMCid:PMC98528

38. Huang X, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Pseudomonas aeruginosa* through induction of IFN-gamma production. J Immunol. 2002;168(11):5756-63.

39. Hazlett LD, Rudner XL, McClellan SA, Barrett RP, Lighvani S. Role of IL-12 and IFN-gamma in *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43(2):419-24.

40. Johansen HK, Hougen HP, Rygaard J, Hoiby N. Interferon-gamma (IFN-gamma) treatment decreases the inflammatory response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats. Clin Exp Immunol. 1996;103(2):212-8. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-618.x
PMid:8565302 PMCid:PMC2200342

41. Hazlett LD, McClellan SA, Rudner XL, Barrett RP. The role of Langerhans cells in P*seudomonas aeruginosa* infection. Invest Ophthalmol Vis Sci.. 2002;43(1):189-97.

42. Saffari M, Behbood S, Irajian G, Khorshidi A, Moniri R, Behrouz B. Antibodies raised against divalent type b flagellin and pilin provide effective immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa* infection of mice with burn wounds. Biologicals. 2017;45:20-6. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.10.007
PMid:27836582

www.SID.ir