Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ یازدهم، شماره ۴، ص ۲۲۷-۲۱۹، ۱۳۸۳

مقالهٔ پژوهشی

تولید و بررسی اثرات محافظت‌بخش واکسن کنژوگه پروتئینی - پلی ساکاریدی در پیشگیری از عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم در موش آزمایشگاهی

دکتر نیما حسینی جزنی[۱]، دکتر قربان بهزادیان‌نژاد[۲] و دکتر شهرام شهابی[۳]

خلاصه

عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم ممکن است به شکل عفونت‌های روده‌ای یا غیرروده‌ای در دام‌ها، پرندگان، کودکان و نوزادان نارس، افراد سالم و افراد مبتلا به نقص ایمنی روی دهد. به دنبال این عفونت‌ها امکان ایجاد عوارض دایمی یا غیردایمی نظیر آندوفتالمیت، استؤمیلیت، سندرم گیلین‌باره و ... در انسان وجود دارد. امروزه سویه‌های سالمونلاتیفی موریوم مقاوم به درمان از سرتاسر دنیا گزارش شده‌اند. با توجه به روند رو به افزایش عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم، امروزه این عفونت‌ها یک خطر جدی محسوب می‌شوند. هدف از این مطالعه طراحی یک واکسن مناسب برای پیشگیری از این عفونت‌ها بود. در این تحقیق زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدیO سالمونلاتیفی موریوم با استفاده از روش آمیداسیون با واسطه کربودیامید به توکسوئید کزاز متصل شد و آزمایش ایمونودیفیوژن انجام شد. به دنبال تلقیح چهار گروه از موش‌های BALB/c با کنژوگه تولیدی، واکسن کشته شده، پلی‌ساکارید خالص و آب مقطر استریل، میزان مرگ و میر وLD50 در هر گروه تعیین شد. نتایج ایمونودیفیوژن نشان داد که شاخص‌های آنتی‌ژنیک پروتئینی و پلی‌ساکاریدی کنژوگه در حین کنژوگاسیون و تخلیص تخریب نشده‌اند و قادر به واکنش با آنتی‌سرم‌های مربوطه می‌باشند. مقایسه LD50 در بین چهار گروه نشان داد که در گروه مورد تزریق با کنژوگه نسبت به گروه مورد تزریق با پلی‌ساکارید خالص و گروه کنترل میزان LD50 به ترتیب ۱۵/۴ و ۱۱/۱۱ برابر افزایش یافته است. مشاهدات انجام شده نشان می‌دهد که واکسن کنژوگه پلی‌ساکارید O با توکسوئید کزاز قادر به ایجاد محافظت در برابر عفونت‌های ناشی از سالمونلا تیفی‌موریوم در موش می‌باشد و در پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری موفق به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلاتیفی موریوم، واکسن کنژوگه، پلی‌ساکارید O

۱- استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی, دانشگاه علوم پزشکی ارومیه ۲- دانشیار گروه میکروب‌شناسی، ۳- دانشجوی دوره دکتری تخصصی گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی, دانشگاه تربیت مدرس

دریافت مقاله: ۱۳۸۲/۱۰/۹ **دریافت اصلاحات:** ۱۳۸۳/۵/۷ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۳/۶/۱۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی عامل ایجادکننده عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای در انسان، دام‌ها و پرندگان است. عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم اکثراً به دنبال مصرف مواد غذایی و آشامیدنی روی می‌دهد. در افراد سالم عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم اکثراً به شکل عفونت‌های روده‌ای روی می‌دهد که گاهی منجر به ایجاد اپیدمی در منطقه می‌شود. عفونت‌های خارج روده‌ای ناشی از این باکتری بیشتر در کودکان، نوزادان نارس، افراد مبتلا به نقص ایمنی، ایدز، لوسمی، آنمی‌سیکل‌سل و ... روی می‌دهد (۱۹،۱۴،۷،۱).

عوامل متعددی در ویرولانس سالمونلاتیفی موریوم نقش دارند ولی ویرولانس باکتری عمدتاً ناشی از مقاومت نسبی لیپوپلی ساکارید باکتری نسبت به فعال‌سازی مکمل از راه فرعی است و لیپوپلی‌ساکارید این باکتری باعث حفاظت آن در برابر بیگانه خواری می‌شود. بنابراین لیپوپلی‌ساکارید مهمترین عامل تهاجم و ویرولانس باکتری و آنتی‌ژن غالب آن محسوب شده و اصطلاح لیپوپلی ساکارید کپسولی به آن اطلاق می‌شود.

لیپوپلی ساکارید به علت سمی بودن نمی‌تواند به عنوان یک واکسن مناسب مورد استفاده قرارگیرد. به منظورغلبه بر این مشکل می‌توان بخش سمی لیپوپلی‌ساکارید (لیپید A) را از آن جدا کرد و پلی‌ساکارید باقی‌مانده را به عنوان واکسن به کار برد اما متأسفانه زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی باقی مانده ایمنی‌زایی کمی داشته و قادر نیست پاسخ ایمنی مناسب را ایجادکند بنابراین هر دو این ملکول‌ها برای تهیه واکسن غیرقابل استفاده‌اند. این پلی‌ساکارید به دلیل آنکه یک آنتی‌ژن غیروابسته به T است پاسخ‌های ایمنی ضعیفی را برمی‌انگیزد و در نوزادان نیز به‌علت تأخیر در تکامل سلول‌های B ایمنی نسبت به پلی‌ساکاریدها دیرتر ودر سنین بالاتر ظاهر می‌شود (۲۱،۱۶).

به منظورافزایش ایمنی‌زایی پلی‌ساکاریدها بهترین راه، متصل نمودن پلی‌ساکارید به یک پروتئین ایمونوژن است و بدین ترتیب یک آنتی‌ژن غیروابسته به تیموس به یک آنتی‌ژن وابسته به تیموس تبدیل می‌شود. این نوع واکسن‌های کنژوگه پروتئین ـ پلی‌ساکارید می‌توانند باعث تغییر کلاس آنتی‌بادی به IgG، ایجاد پاسخ‌های خاطره‌ای قوی در برابر پلی‌ساکارید و افزایش تمایل اتصال آنتی‌بادی‌های تولیدی به آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی شده و لنفوسیت‌های Thelper را به منظور کمک‌رسانی برای تولید آنتی‌بادی درگیرنمایند و نیز باعث برانگیخته‌شدن پاسخ ایمنی حتی در سنین پایین شوند. نکته فوق در کنترل عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم بسیار مهم است زیرا حداکثر میزان ابتلاء و مرگ و میر ناشی از سالمونلا تیفی موریوم در نوزادان و کودکان کم سن دیده می‌شود.

بنابراین واکسن‌های کنژوگه می‌توانند مقدار زیادی IgG در برابر جزء پلی ساکاریدی خود برانگیزند و مدت دوام محافظت ایجاد شده نیز نسبتاً طولانی است. همچنین این واکسن‌ها باعث برانگیختن آنتی‌بادی‌های هومورال حتی در کودکان و نوزادان می‌شوند(۱۰،۸).

از طرفی با توجه به مقاومت باکتری به فعال شدن مکمل از راه فرعی تولید آنتی‌بادی‌های اپسونین نقش مهمی در بلعیده شدن باکتری توسط ماکروفاژها دارد و نیز کمپلکس آنتی‌ژن با آنتی‌بادی اختصاصی قادر است $Fc\gamma\ resptor_I$ رادر سطح ماکروفاژها تحریک کند و متعاقباً

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت ماکروفاژها نیز برای کشتن سالمونلاتیفی موریوم افزایش می‌یابد(۱۲).

واکسن‌های حاوی سلول‌های کامل کشته شده به‌علت سمیت و ایمنی‌زایی کم چندان مناسب نبوده و واکسن‌های زنده ضعیف شده‌ای که تا به حال طراحی‌شده‌اند نیز به دلایل متعدد چندان قابل قبول نمی‌باشند (۱۱،۹). در مجموع مشاهدات انجام شده نشان می‌دهد که واکسن‌های کنژوگه پلی ساکارید O با پروتئین‌های ایمونوژن درپیشگیری از عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم بسیار موفق به نظر می‌رسند.

بنابراین در این پژوهش کنژوگاسیون زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی سالمونلاتیفی موریوم با توکسوئید کزاز با روش آمیداسیون با واسطه کربودیامید با استفاده از EDC (1-ethyl3-dimethylaminopropyle carbodimide hydrochloride) صورت گرفت. به دنبال ایمونیزاسیون موش‌های BALB/c با کنژوگه تولیدی، خونگیری از موش‌ها به عمل آمد و نمونه‌های سرم جداسازی شد، ایمونودیفیوژن با انتشار دوجانبه آنتی‌ژن وآنتی‌بادی در ژل آگارز انجام شد.

میزان محافظت ایجاد شده در حیوانات ایمن شده با تزریق دوزهای مختلف باکتری پاتوژن بررسی و LD50 با روش Reed و Muench تعیین شد (۱۵).

مواد و روش کار

کنژوگاسیون: زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O با برخی تغییرات ناشی از تجربه کاری با روش Chu و همکاران (۵) با توکسوئیدکزازکنژوگه شد. به طور خلاصه زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای اطاق حل شد و با استفاده از سود یک نرمال pH محلول به ۱۰/۵ رسانیده شد. ۱۲۵ میکرولیتر از محلول سیانوژن بروماید (Merck) به غلظت ۰/۲گرم در میلی‌لیتر در استونیتریل (Merck) اضافه شد و مجدداً pH محلول در ۱۰/۵ تنظیم شد. پس از ۲/۵ دقیقه، ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ مولار ادیپیک اسید دی‌هیدرازید (Sigma) همراه با بیکربنات سدیم با غلظت ۰/۵ مولار اضافه شد و مجدداً pH در حد ۸/۵ تنظیم شد. سپس این مخلوط در طول شب در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به دنبال آن ملکول ادیپیک اسید دی‌هیدرازید متصل به زنجیره جانبی O با استفاده از ستون حاوی سفادکس ۲۵ – G با حجم کاری ۳۰ × ۲ سانتی‌متر که با آب مقطر به تعادل رسیده بود تخلیص شد و فراکسیون‌های حاوی نمونه با هم ادغام شده و در سرما خشک شدند.۲۰ میلی‌گرم از آنتی‌ژن تهیه شده به ۲۰ میلی‌گرم توکسوئید کزاز (مؤسسه رازی حصارک) اضافه شد و حجم نمونه با استفاده از سرم فیزیولوژی به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. EDC با غلظت ۰/۱ مولار افزوده شد و نمونه به مدت ۴ ساعت در حالی که روی یخ قرار داشت به هم زده شد. سپس به مدت دو روز در برابر محلول ۰/۲ مولار کلریدسدیم دیالیز شد. برای خالص‌سازی کنژوگه از ملکول‌های غیرکنژوگه از ستون سفارز 2B با حجم کاری ۹۰×۱ سانتی‌متر که با محلول ۰/۲ مولار کلریدسدیم به تعادل رسیده بود استفاده شد. فراکسیون‌های حاوی کنژوگه جمع‌آوری شده و با هم ادغام شدند و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۵).

اندازه‌گیری مقدار کلی کربوهیدرات‌ها با استفاده از روش فنل ــ سولفوریک اسید (۶) و تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد انجام شد (۳).

ایمونیزاسیون موش‌ها و خون‌گیری: موش‌های ماده ۸-۶ هفته‌ای از نژاد BALB/c از مؤسسه رازی خریداری شد و به منظور ایمونیزاسیون با^{۸}۱۰× ۱ عدد سلول کامل کشته

www.SID.ir

Archive of SID

شده سالمونلاتیفی موریوم و یا ۱۰ میکروگرم زنجیره پلی‌ساکاریدی O خالص شده و یا کنژوگه، به طریقه داخل صفاقی مورد تزریق قرار گرفتند. تزریق ۳ بار در روزهای صفر و ۱۴ و ۲۸ تکرار شد. دو هفته بعد خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام شد و سرم خون جداسازی شده و تا زمان انجام آزمایشات در ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲).

ایمونودیفیوژن: تهیه پلیت‌های حاوی آگارز برای انجام آزمایش انتشار دوگانه در ژل به منظور اثبات تولید آنتی‌بادی‌های سرمی برعلیه زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدیO و توکسوئید کزاز با روش استاندارد صورت گرفت. پس از تهیه پلیت حاوی آگارز با غلظت ۱/۵گرم در۱۰۰ چاهک‌هایی در ژل ایجاد کرده و پس از شماره‌گذاری چاهک‌ها بر اساس الگوی طراحی شده، آنتی‌ژن‌ها یا سرم حیوانات تحت آزمایش در چاهک‌ها ریخته شد و پلیت‌ها یک تا سه روز در اطاقک مرطوب در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و از نظر تشکیل خطوط رسوبی مورد بررسی قرارگرفتند. ژل‌ها چندین بار با PBS و سپس آب مقطر شستشو داده شدند تا پروتئین‌های آزاد و خطوط رسوبی غیراختصاصی حذف شوند.

رنگ‌آمیزی خطوط رسوبی با استفاده از محلول کوماسی بریلیان‌بلو R-250 (Pharmacia) صورت گرفت و پس از رنگ‌آمیزی ژل به ظرف حاوی محلول رنگ‌بر (آب-اسیداسیتیک-متانول به نسبت حجمی ۵:۸:۴۲) انتقال داده شد و تا بی‌رنگ شدن کامل زمینه در محلول رنگ‌بر باقی ماند. سپس سطح ژل با کاغذ صافی خیس پوشانده شده و در حرارت اطاق خشک شد.

به منظورتعیین تب‌زایی کنژوگه تولیدی ازآزمون تب‌زایی در خرگوش (۱۳) و به منظور تعیین سمیت و استریلیتی کنژوگه تولیدی از آزمون‌های استاندارد استفاده شد (۲۰).

روش انجام آزمایش محافظت حیوان ایمن در برابر دوز عفونی باکتری بیماری‌زا: پس از ایمونیزاسیون ۴۸ عدد موش BALB/c با کنژوگه، سلول کامل کشته شده و یا زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O و یا آب‌مقطر استریل، هر یک از گروه‌های تحت آزمایش و کنترل به ۶ گروه هر یک حاوی ۸ موش تقسیم شدند. یک هفته پس از آخرین تزریق، سالمونلا تیفی موریوم بیماری‌زا روی محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار (Merck) کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اتوگذاری شد. از کلنی‌های حاصل رقت‌های متوالی در سرم فیزیولوژی که به ترتیب حاوی 10^{8} ، 10^{7}،10^{6}،10^{5} ،10^{4} ،10^{3} و10^{2}عدد باکتری در فاز لگاریتمی می‌باشند تهیه و به هر یک ازگروه‌های ۸تایی تحت آزمایش و یا کنترل به صورت داخل صفاقی۰/۲ سی‌سی تزریق گردید. پس از ۲۱ روز موش‌ها مورد بررسی قرار گرفته و میزان مرگ و بقاء یادداشت و مقادیرLD50 بر اساس روش رید و مینچ تعیین شد(۱۵).

نتایج

کنژوگاسیون زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O با آدیپک اسید دی‌هیدرازید: پس ازلیوفلیزاسیون فراکسیون‌های حاوی زنجیره O متصل به آدیپک اسید دی‌هیدرازید حاصل از ستون سفادکس G-25، مقدار زنجیره O متصل به آدیپک اسید دی‌هیدرازید تعیین شد. به ازاء ۵۰ میلی‌گرم زنجیره جانبی O تزریق شده به ستون، ۴۳/۵ میلی‌گرم کنژوگه در حجم خالی از ستون خارج شد (نمودار ۱).

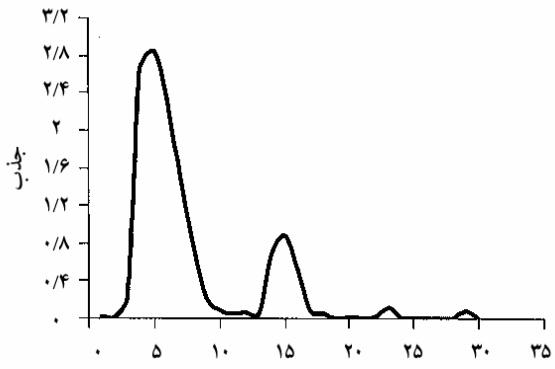
همان‌طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود ملکول‌های کنژوگه نشده پلی‌ساکاریدی به علت سبک‌تر بودن در

www.SID.ir

Archive of SID

فراکسیون‌های پس از حجم خالی از ستون سفادکس G-25 خارج شدند.

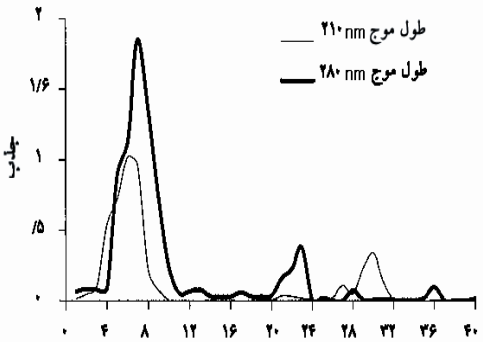
کنژوگاسیون مشتق ادپیک اسیددی هیدرازید ـ پلی ساکارید با توکسوئید کزاز: نتایج مربوط به کنژوگاسیون پلی‌ساکاریدباتوکسوئید کزاز در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار دیده می‌شود قله‌های مربوط به جذب در حجم خالی در طول موج‌های ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر بر روی هم منطبق است که نشان دهنده حضور ملکول کنژوگه شده در فراکسیون‌های مربوط به حجم خالی می‌باشد. نمودار قرائت شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارای قله کوچک دومی نیز هست که مربوط به توکسوئید کزاز کنژوگه نشده است و نیز نمودار قرائت شده در طول موج ۲۱۰ نانومتر نیز دارای قله کوچک دومی است که مربوط به زنجیره پلی‌ساکاریدی O کنژوگه نشده است. مقدار پلی‌ساکارید و پروتئین کنژوگه نشده در فراکسیون‌های مربوط به حجم خالی به ترتیب با روش فنل ـ سولفوریک اسید و برادفورد تعیین شد و کارایی کنژوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای توکسوئید کزاز ۸۰/۵٪ و برای مشتق ادپیک اسید دی‌هیدرازید ـ پلی‌ساکارید ۳۸٪ محاسبه شد. (جدول ۱).



شماره فراکسیون

نمودار ۱: *طیف جذبی فراکسیون‌های مختلف حاصل از ستون سفادکس G-25 در طول موج ۲۱۰ نانومتر.*

همان‌طور که مشاهده می‌شود منحنی دارای ۲ قله است. قله اول در قسمت مربوط به حجم خالی است که با توجه به افزایش وزن زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی پس از کنژوگاسیون با ادپیک اسید دی هیدرازید، مربوط به کنژوگه بوده و قله دوم که حاوی مقدار کمتری پلی‌ساکارید است حاوی زنجیره جانبی O کنژوگه نشده است.



شماره فراکسیون

نمودار۲: *طیف جذبی فراکسیون‌های مختلف حاصل از ستون سفارز 2B را در طول موج‌های ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر نشان می‌دهد.*

مشاهده می‌شود که کنژوگه در فراکسیون‌های حجم خالی از ستون خارج شده است.

جدول۱: *درصد کارایی کنژوگاسیون بر حسب وزن پلی‌ساکارید و پروتئین کنژوگه شده و غیرکنژوگه*

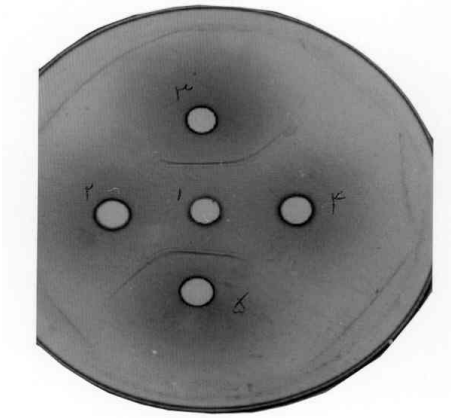
وزن(میلی‌گرم) / نوع ترکیب	کنژوگه	غیرکنژوگه	کارایی
ADH-Ochain	۷/۶	۱۲/۴	٪۳۸
پروتئین	۱۶/۱	۳/۹	٪۸۰/۵

آزمایش انتشار دوگانه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در ژل اگارز: نتایج مربوط به آزمون انتشار دوگانه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در ژل اگارز در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنان که مشاهده می‌شود توکسوئید کزاز و کنژوگه هر دو با

www.SID.ir

Archive of SID

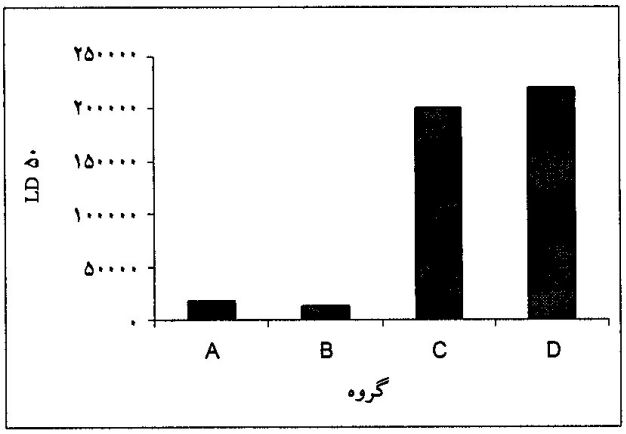
آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه توکسوئید کزاز واکنش داده‌اند. همچنین کنژوگه و زنجیره جانبی O هر دو با آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه جسم باکتری واکنش داده‌اند. با توجه به نتایج حاصل می‌توان نتیجه گرفت که ساختار آنتی‌ژنیک توکسوئید کزاز و زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O درحین کنژوگاسیون تخریب نشده است و قادر به واکنش با آنتی‌بادی‌های مربوطه می‌باشند.



شکل ۱: *آزمون ایمنودیفیوژن، چاهک شماره ۱ (کنژوگه)، چاهک شماره ۲ (پلی‌ساکارید خالص)، چاهک شماره ۳ (آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه توکسوئید کزاز)، چاهک شماره ٤ (توکسوئید کزاز)، چاهک شماره ۵ (آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه سلول کشته شده سالمونلاتیفی موریوم). کلیه آنتی‌ژن‌ها به حجم ۵۰ میکرولیتر و با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها تزریق شدند.*

آزمون تب‌زایی، سمیت و استریلیتی: نمونه کنژوگه طراحی شده به منظور انجام آزمایشات تب‌زایی، سمیت و استریلیتی به بخش فراورده‌های بیولوژیک انستیتو پاستور ایران ارسال شد و بر اساس دستورالعمل استاندارد به مدل آزمایشگاهی تزریق شد. نتایج به دست آمده نشان داد که نمونه در دوز قابل تزریق عاری از ماده تب زا، غیرسمی و عاری از حضور باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی و قارچ بوده و لذا قابل تزریق می‌باشد.

آزمایش محافظت حیوان ایمن در برابر دوز عفونی باکتری بیماری‌زا: نتایج مربوط به این آزمایش در جدول ۲ و نمودار۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج می‌توان دریافت که میزان مرگ و میر در موش‌هایی که با کنژوگه یا جسم کشته شده سالمونلاتیفی موریوم مورد تزریق قرار گرفته بودند در مقایسه با موش‌های گروه کنترل یا موش‌هایی که زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O را دریافت نموده بودند کاهش یافته و LD50 در دو گروه اول افزایش یافته است. بنابراین کنژوگه تولیدی قادر به ایجاد محافظت نسبی در برابر عفونت ناشی از سالمونلاتیفی موریوم در موش آزمایشگاهی است (جدول۲ و نمودار۳).



نمودار ۳: *مقایسه LD_{50} محاسبه شده در چهار گروه*

همچنان‌که مشاهده می‌شود LD_{50} گروه مورد تزریق با کنژوگه (C) نسبت به گروه کنترل (B) و گروه مورد تزریق با زنجیره پلی‌ساکاریدی O (A) به ترتیب ۱۵/٤ و ۱۱/۱۱ برابر افزایش یافته است در گروه مورد تزریق با جسم کشته شده باکتری LD50 (D) نسبت به گروه B و A به ترتیب ۱٦/۹ و ۱۲/۲ افزایش یافته است. در گروه D نسبت به گروه C LD_{50} افزایش قابل توجهی نشان نمی‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲: *میزان محافظت ایجاد شده در برابر عفونت ناشی از دوزهای مختلف سالمونلاتیفی موریوم PTCC۱۷۳۵ در موش ایمن شده*

دوز / گروه	$۱۰^{۲}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{٤}$	$۱۰^{٥}$	$۱۰^{٦}$	$۱۰^{۷}$
درصد بقا در گروه A	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۱۲/۵	۰
درصد بقا در گروه B	٪۱۰۰	٪۸۷/۵	٪۵۰	٪۲۵	۰	۰
درصد بقا در گروه C	٪۱۰۰	٪۸۷/۵	٪۶۲/۵	٪۶۲/۵	٪۵۰	٪۱۲/۵
درصد بقا در گروه D	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۶۲/۵	٪۷۵	٪۳۷/۵	۰

تعداد موش‌ها در هر گروه = ۸ عدد

تزریق زنجیره پلی‌ساکاریدی O ، $۱۰^{۴}$*۱/۸ = LD50: گروه A

(گروه کنترل) تزریق آب مقطر استریل، $۱۰^{۴}$* ۱/۳ = LD50 : گروه B

تزریق کنژوگه، $۱۰^{۵}$* ۲= LD50: گروه C

تزریق جسم کامل کشته شده سالمونلا تیفی موریوم، $۱۰^{۵}$* ۲/۲ = LD50: گروه D

بحث

در این تحقیق به منظورکنژوگاسیون توکسوئیدکزازبا آنتی‌ژن O از آدیپیک اسید دی‌هیدرازید به عنوان فاصله‌گذار (spacer) استفاده شد. این ملکول ۶ کربنه بین ملکول‌های کربوهیدرات و پروتئین قرار می‌گیرد. واسطه آدیپیک اسید دی هیدرازید-پلی‌ساکارید تولید شده قادر است به گروه‌های آمین موجود در پروتئین‌ها به طورکوالانسی متصل شود. Schneerson و همکاران از ۶ نوع متفاوت Spacer برای کنژوگاسیون پروتئین‌های مختلف با پلی‌ساکارید کپسول هموفیلوس آنفلونزا استفاده نمودند و نشان دادند که تنها آدیپیک اسید دی‌هیدرازید می‌تواند با کارایی بالایی باعث اتصال کوالانسی کپسول به پروتئین‌های مختلف شود (۱۷).

در بررسی حاضر به ازای هر مول از زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O حدود ۸ مول از ادیپیک اسید دی‌هیدرازید مورد استفاده قرار گرفت. این نسبت در مطالعات Shneerson و همکاران ۲۰ برابر و در بررسی‌های Watson و همکاران ۷/۵ برابر بوده است (۲۲،۱۷). به هرحال گزارشات مختلف نشان می‌دهد که انتخاب نسبت مناسب از آدیپیک‌اسید دی‌هیدرازید و پلی‌ساکارید در افزایش کارایی کنژوگاسیون پروتئین با پلی‌ساکارید نقش دارد (۲۲،۱۷،۲).

به منظور کنژوگاسیون توکسوئید کزاز با پلی‌ساکارید از واکنش آمیداسیون با واسطه کربودیامید استفاده شد. EDC یک کربودیامید با حلالیت بسیار بالا در آب است و حضور آن در محیط باعث تشکیل پیوند کربوکسیل با آمین می‌شود و بازده محصول را تا۹۰٪ افزایش می‌دهد. EDC در۴/۵-۴ pH دارای حداکثر فعالیت است (۱۸).

Shneerson و همکاران بهترین pH برای فعالیت EDC را ۴/۷ و Byrd و Kadis بین ۴/۵ تا ۵ ذکر نموده‌اند (۱۷،۴)، به هر حال ما بهترین نتیجه را در pH=۵/۸ به دست آوردیم.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدار پروتئین و پلی‌ساکاریدکنژوگه شده در فراکسیون‌های مربوط به حجم خالی به ترتیب با روش فنل- سولفوریک اسید و برادفورد تعیین شد وکارایی کنژوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای توکسوئید کزاز ۸۰/۵٪ و برای آدیپیک‌اسید دی‌هیدرازید- پلی‌ساکارید ۳۸٪ محاسبه شد. محاسبات انجام شده برحسب وزن مولی ملکول‌های مورد نظر نشان می‌دهد که در ساختار کنژوگه تولیدی به ازاء هر ملکول توکسوئید کزاز دو ملکول زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O حضور دارد.

کارایی کنژوگاسیون در مطالعه Watson و همکاران ۳۵٪ به ازاء وزن زنجیره پلی‌ساکاریدی بوده است. در بررسی Shneerson و همکاران کارایی کنژوگاسیون بر حسب وزن پروتئین مورد استفاده حدود۹۰٪ تخمین زده شده است. بنابراین نتایج ما با نتایج به دست آمده توسط این محققین مطابقت دارد (۲۲،۱۷).

نتایج ایمونودیفیوژن نشان می‌دهد ساختار آنتی‌ژنیک توکسویید کزاز و زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O در حین کنژوگاسیون تخریب نشده و قادر به واکنش با آنتی‌بادی‌های مربوطه می‌باشند و نیز با توجه به اینکه کنژوگه تولیدی با استفاده از ستون سفارز 2B از ملکول‌های پلی‌ساکاریدی و پروتئینی غیرکنژوگه تفکیک شده است، می‌توان نتیجه گرفت که این دو ملکول به طور کوالانسی به هم متصل شده‌اند.

تزریق ۳ دوزازکنژوگه تولیدی (هر دوز ۱۰ میکروگرم)، موش‌های تحت آزمایش را در مواجهه داخل صفاقی با سالمونلاتیفی موریوم زنده پاتوژن محافظت کرده و LD50 را نسبت به گروه کنترل و گروه مورد تزریق با پلی‌ساکارید خالص به ترتیب ۱۵/۴ و ۱۱/۱۱ برابر افزایش داد. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی تخلیص شده سالمونلاتیفی موریوم قادر به تحریک تولید آنتی‌بادی در موش نمی‌باشد و بنابراین محافظت بخش نیست. پس می‌توان نتیجه گرفت که کنژوگه تولیدی باعث تبدیل این پلی‌ساکاریدکه یک آنتی‌ژن غیروابسته به تیموس است به یک آنتی‌ژن وابسته به تیموس شده است و بنابراین آنتی‌ژن O متصل به توکسوئید کزاز قادر به تحریک سیستم ایمنی و ایجاد محافظت در مواجهه با باکتری زنده پاتوژن است.

در گروه مورد تزریق با سالمونلاتیفی موریوم کشته شده با حرارت در مقایسه با گروه مورد تزریق با کنژوگه LD50 به طور محسوسی افزایش نیافته است (۱/۱ برابر) که نشان می‌دهدکه اکثر پاسخ‌های محافظت‌بخشی که به دنبال تزریق جسم سلولی کشته شده در موش BALB/c ایجاد می‌شوند با تزریق کنژوگه نیز ایجاد شده‌اند و قادر به محافظت موش در مواجهه با باکتری‌های زنده پاتوژن می‌باشند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به سمیت بالای واکسن‌های کشته شده وکارایی کم واکسن‌های خوراکی زنده ضعیف شده، انجام سایر آزمایشات تکمیلی در مورد این نوع واکسن‌ها و استفاده از آنها برای پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری در اولویت قرار دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Arda IS، Ergin F، Varan B، Demirhan B، Aslan H and Ozyaylali I. Acute abdomen Caused by *Salmonella typhimurium* infection in children. *J Pediatr Surg* 2001; 36 (12): 1849-52.
2. Bergquist C، Lagergard T، Lindblad M and Holmgren J. Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates. *Infect Immun* 1995; 63(5):2021-2025.
3. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
4. Byrd W، Kadis S. Preparation، characterization، and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Infect Immun* 1992; 60(8):3042-3051.
5. Chu CY، Liu BK، Watson D *et al.* Preparation، characterization and immunogenicity of conjugates composed of the O-specific polysaccharide of Shigella dysenteriae type1 (Shiga's bacillus) bound to tetanus toxoid. *Infect Immun* 1991; 59(12): 4450-8.
6. Dubois M، Gilles KA، Hamilton JK، Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28:350-356.
7. Eaton EE، Dobrozycski J، Loas R، Laddis D and Fennelly GJ. Nontyphoidal *Salmonella* bacteremia and pneumonia as the initial manifestation of human immunodeficiency virus infection in a four – year – old Child. *AIDS Patient Care STDS* 2002; 16(6): 247-50.
8. Guttormsen HK، Sharpe AH، Chandraker AK، Brigtsen AK، Sayegh MH and Kasper DL. Cognate Stimulatory B-cell-T-cell interactions are Critical for T-cell help recruited by glycoconjugate vaccines. *Infect Immun* 1999; 67(12): 6375-84.
9. Mitov I، Denchev V and Linde K. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral Vaccines of *Salmonella typhimunium*: auxothrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine* 1992; 10 (1): 61-6.
10. Mond JJ، Lees A and Snapper CM. T-cell independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 655-692.
11. Mukkur TK، McDowell GH، Stocker BA and Lascelles AK. protection against experimental Salmonellosis in mice and sheep by immunization with aromatic-dependent *Salmonella typhimurium*. *J Med Microbiol* 1987; 24(1): 11-19.
12. Paul W: Immunity to intracellular bacteria. In: Fundamental Immunology. Vol. 3، 4th ed.، Philadelphia، Lippincott-Raven، 1998; PP1335-1372.
13. Pyrogen test، In:United States Pharmacopoeia 23 rd، Revision، U.S. Pharmacopoeial Convention، Inc.، Rockville، M.D.، D. 1995; 1718-19.
14. Rahman H. Some aspects of molecular epidemiology and Characterisation of *Salmonella typhimurium* isolated from man and animals. *Indian J Med Res* 2002; 115: 108-12.
15. Reed LJ and Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-497.
16. Robbins JB and Schneerson R. Polysaccharide-protein Conjugates: A new generation of Vaccines. *J infect Dis* 1990; 161(5): 821-832.
17. Schneerson R، Barrera O، Sutton A and Robbins JB. Preparation، Characterization and Immunogenicity of Haemophilus Influenzae type b polysaccharide–protein Conjugates. *J Exp Med* 1980; 152(2): 361-376.
18. Sehgal D and Vijay IK. A Method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide–mediated amidation. *Anal Biochem* 1994; 218(1): 87-91.
19. Spieckermann D، Lutticken R and Goertz B. *Salmonella* meningitis in adults: a case of *Salmonella typhimurium* infection. *Infection* 1973; 1(3): 178-80.
20. Toxicity test، In:United States Pharmacopoeia 23 rd، Revision، U.S. Pharmacopoeial Convention، Inc.، Rockville، M.D.، D. 1718، 1995.
21. Valtonen VV. Mouse Virulence of *Salmonella* Strains: the effect of different Smooth-type O Side-chains. *J Gen Microbiol* 1970; 64(3): 255-268.
22. Watson DC، Robbins JB and Szu SC. Protection of mice against *Salmonella typhimurium* with an O-Specific polysaccharide-protein Conjugate Vaccine. *Infect Immun* 1992; 60(11): 4679-86.

www.SID.ir