Archive of SID

ارزيابي ايمونولوژيکي OMP-F وزيکول سودوموناس آئروژينوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ به عنوان واکسن حفاظتي در مدل موش

دکتر حجت احمدي[۱*]، دکتر بهمن تبرائي[۱]، مهدي نجاتي[۱]، دکتر سيدداور سيادت[۱]، فرحناز پورميرزاقلي[۲]

۱- بخش واکسن‌هاي باکتريايي و تهيه آنتي‌ژن، مجتمع تحقيقاتي و توليدي انستيتو پاستور ايران

۲- مؤسسه تحقيقات صنعتي بيوتکنولوژي KFG

Title: *Immunological evaluation of OMP-F vesicle of Pseudomonas aeruginosa CSBPI: 16-190 as a protective vaccine in mice model*

Authors: *Ahmadi H,(PhD); Tabaraie B,(PhD); Nejati M,(M.Sc); Siadat SD,(PhD); Pormirzagholi F(BSc).*

Introduction: *Prevention and control of Pseudomonas aeruginosa infections are still among serious nosocomial problems worldwide, since chemotherapeutic control of the infection generally fails. Therefore, using a safe and reliable vaccine against all wild Pseudomonas aeruginosa serotypes is the only solution to overcome this problem.*

Methods: *300 Pseudomonas aeruginosa strains were isolated from patients admitted to four Tehran hospitals. Using standard O-specific typing sera, they were all grouped in 16 out of 17 known Pseudomonas aeruginosa serotypes. The 16 serotypes were lyophilized and each given a code according to the Collection of Standard Bacteria of Pasteur Institute of Iran (CSBPI) for further investigation. Among all clinical samples, CSBPI: 16-190 was the most prevalent Pseudomonas aeruginosa serotype which showed a high agglutination titer against homologous O-specific typing sera. This serotype was selected for extraction of Pseudomonas aeruginosa major outer membrane vesicles (OMP-F).OMP-F vesicles were extracted and purified by deoxycholate ultracentrifuge-differentiation technique. After molecular evaluation, protective activities and safety of the OMP-F vesicles were determined in animal models.*

Results: *Preset investigation reveals that, purified OMP-F vesicles of Pseudomonas aeruginosa CSBPI: 16-190 is able to induce a high level of protection against all 16 live homologous and heterologous native Iranian Pseudomonas aeruginosa serotypes. Besides, it was pyrogen free and did not produce any detectable abnormal toxicity in rabbits, mice and guinea pigs.*

Discussion: *The results showed that purified OMP-F vesicles of Pseudomonas aeruginosa CSBPI: 16-190 can be considered a safe and protective immunogen in vaccine therapy against infections caused by all native Pseudomonas aeruginosa immunotypes in Iran.*

Keyword: *OMP-F vesicles, Pseudomonas aeruginosa, vaccine.*

Hakim 2006;9(1):38-44.

* نويسنده مسؤول: بخش واکسن‌هاي باکتريايي و تهيه آنتي‌ژن، مجتمع تحقيقاتي و توليدي انستيتو پاستور ايران، کيلومتر ۲۵ اتوبان تهران - کرج، تلفن: ۶۱۰۲۹۳۸-۰۲۶۱، نمابر: ۶۱۰۲۹۰۰-۰۲۶۱

پست الکترونيک: hojiahmadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

چکيده

مقدمه: *کنترل و پيشگيري عوارض ناشي از عفونت سودوموناس آئروژينوزا يکي از معضلات عمده در عفونت‌هاي بيمارستاني در سراسر جهان است. زيرا دارودرماني عفونت‌هاي بيمارستاني به‌ويژه با تجويز آنتي‌بيوتيک‌ها غالباً با شکست روبرو مي‌گردد. بنابراين تنها راه جلوگيري از عوارض ناشي از سودوموناس آئروژينوزا مصرف واکسن بي‌زيان و مؤثري است که بدن را عليه کليه سروتيپ‌هاي مختلف بومي حفاظت نمايد.*

روش کار: *از نمونه‌هاي باليني جمع‌آوري شده از بيمارستان‌هاي تهران، ۳۰۰ گونه سودوموناس آئروژينوزا ايزوله و شناسايي گرديد، با استفاده از آنتي‌سرم‌هاي اختصاصي سماتيک (O) جملگي در ۱۶ سروتيپ از ۱۷ سروتيپ شناخته شده سودوموناس آئروژينوزا قرار گرفتند. پس از کدگذاري و تهيه کشت خالص، ۱۶ سروتيپ انتخابي ليوفليزه شده و در کلکسيون باکتري‌هاي استاندارد انستيتو پاستور ايران(CSBPI) نگهداري گرديدند. سروتيپ ۱۹۰-۱۶ :CSBPI که يکي از شايع‌ترين سروتيپ‌هاي سودوموناس آئروژينوزا را تشکيل داده و بيشترين واکنش سرولوژيک را با آنتي‌سرم اختصاصي خود نشان مي‌دهد، به‌عنوان مدل جهت تهيه OMP-F وزيکول لايه خارجي ديواره سلولي سودوموناس آئروژينوزا انتخاب گرديد. OMP-F وزيکول به روش دزاکسي کولات-اولترا سانتريفيوژ افتراقي از غشاي خارجي سروتيپ ۱۹۰ -۱۶:CSBPI استخراج شد. پس از بررسي ملکولي، فعاليت حفاظتي و بي‌زياني آن در مدل حيوانات آزمايشگاهي مورد بررسي قرار گرفت.*

نتايج: *تحقيق حاضر نشان مي‌دهد که OMP-F تخليص شده از سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ فعاليت حفاظتي قابل توجهي را عليه ۲×LD۵۰ از ۱۶ سروتيپ سودوموناس آئروژينوزا هموگ و هترولگ زنده بومی ايران از خود نشان مي‌دهد به علاوه تب‌زا نبوده و فاقد هرگونه سميت قابل سنجش در خرگوش، موش و خوکچه هندي مي‌باشد.*

بحث: *ارزيابي نتايج حاصل از تحقيق انجام شده نشان مي‌دهد که OMP-F وزيکول غشاي خارجي ديواره سودوموناس آئروژينوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ را مي‌توان به‌عنوان ايمونوژني مفيد و مؤثر با طيف وسيع حفاظتي عليه عفونت‌هاي ناشي از آلودگي سروتيپ‌هاي مختلف سودوموناس آئروژينوزا بومي ايران به‌کار گرفت.*

گلواژگان: *OMP-F وزيکول، سودوموناس آئروژينوزا، واکسن.*

مقدمه

سودوموناس آئروژينوزا يکي از شايع‌ترين باکتري‌هاي فرصت‌طلب در عفونت‌هاي نوزوکوميالي است که همواره کنترل و پيشگيري عوارض ناشي از آن از زمره معضلات بهداشتي در سراسر جهان به‌شمار مي‌رود (۱). ماهيت دوزيستي (انگلي و ساپروفيتي) سودوموناس آئروژينوزا سبب گرديده تا ميزان گسترش شيوع آن در بيماران سوانح و سوختگي، مبتلايان به سيستيک فيبروزا و نئوپلاستي، افراد مبتلا به نقص سيستم ايمني، کساني که تحت عمل جراحي قرار گرفته‌اند وبيماراني که پيوند اعضا داشته يا دستگاه‌هاي مصنوعي در بدن آنها کار گذاشته شده است، بسيار بالا باشد (۳-۱).

سودوموناس آئروژينوزا داراي ۱۷ سروتيپ شناخته شده است. اگر چه انتشار هر يک از طريق هوا، آب، خاک، پوست و البسه نيز امکان‌پذير است اما انتقال فعال نوزوکوميالي آنها غالباً به علت عدم رعايت موازين بهداشت عمومي پرسنل بيمارستاني، بيماران ناقل و استفاده از تجهيزات پزشکي آلوده مي‌باشد. کنترل سريع عفونت سودوموناسي به علت مصرف بي‌رويه دارو و مقاومت دارويي بالا به‌ويژه

www.SID.ir

Archive of SID

عليه آنتي‌بيوتيک‌هاي متداول، غالباً با شکست روبرو مي‌گردد. به اين جهت است که امروزه ايمونوتراپي بيماران با واکسني بي‌زيان و مؤثر به‌منظور جلوگيري از عوارض ناشي از سودوموناس آئروژينوزا بسيار اميدبخش است (۴ و ۵).

تزريق زيرجلدي دوز مؤثري از ليپوپلي ساکاريد[1] خالص و يا دتوکسيفايد، سودوموناس آئروژينوزا به‌عنوان ايمونوژني فعال توسط بسياري از محققان پيشنهاد گرديده است (۹-۶). اما ماهيت پاتوفيزيولوژيک LPS و اختصاصي بودن فعاليت‌هاي ايمونولوژيک سروتيپ‌هاي مختلف آن، مصرف LPS را جهت کنترل عفونت‌هاي سودوموناسي عملاً محدود نموده است (۱۰-۶). در صورتي که استفاده از پروتئين‌هاي عمده غشاي خارجي ديواره سلولي[2] سودوموناس آئروژينوزا و ساير باکتري‌هاي گرم منفي نه تنها غيرسمي بوده و سيستم ايمني بدن را فعالانه تحريک مي‌نمايند، بلکه با mOMPs ساير سروتيپ‌هاي متعلق به يک گونه نيز واکنش ايمونولوژيک متقاطع از خود نشان مي‌دهند (۱۵-۱۱).

نظر به اينکه OMP-F وزيکول با وزن ملکولي ۳۷-۳۵ کيلودالتون عمده‌ترين پروتئين غشاي خارجي ديواره سلولي سودوموناس آئروژينوزا را تشکيل مي‌دهد بنابراين مي‌توان آن را به‌عنوان کانديدي مفيد و مؤثر در واکسينوتراپي بيماران عليه سروتيپ‌هاي مختلف سودوموناس آئروژينوزا به‌شمار آورد (۱۱ و۱۶ و ۱۷).

روش کار

سروتيپ باکتري و شرايط کشت: توسط محيط انتقالي کاري بلر اصلاح‌شده، ۳۰۰ نمونه باليني سودوموناس آئروژينوزا از بيماران بستري در چهار بيمارستان امام خميني، طالقاني، شريعتي و سوانح و سوختگي تهران جمع‌آوري گرديد. پس از کشت نمونه‌ها در محيط اختصاصي سودوموناس آگار (شرکت مرک)، با استفاده از کيت کامل آنتي‌سرم هاي سماتيک (O) سودوموناس آئروژينوزا (شرکت ديفکو) مشخص شد که به استثناي سروتيپ ۱۴، جملگي در ۱۶ سروتيپ از ۱۷ سروتيپ شناخته شده سودوموناس آئروژينوزا قرار دارند. سروتيپ‌ها پس از کدگذاري و ليوفليزاسيون سريع توسط دستگاه ليوفليزاتور (يوزي فرويد) در مرکز کلکسيون نگهداري باکتري‌هاي استاندارد بخش واکسن‌هاي باکتريايي انستيتو پاستور ايران به‌صورت ذخيره[3] دايمي نگهداري گرديدند.

شدت آگلوتيناسيون ml ۹×۱۰^{۸} از سلول کشته شده هر يک از سروتيپ‌ها عليه آنتي‌سرم هاي سماتيک هومولگ به روش سرولوژيک لوله مورد مقايسه قرارگرفت. سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژينوزا که با آنتي‌سرم اختصاصي خود بيشترين واکنش آگلوتيناسيون را نشان داده و يکي از شايع‌ترين سروتيپ‌ها را تشکيل مي‌داد جهت استخراج OMP-F از ديواره سلولي انتخاب گرديد.

تهيه بذر و شرايط کشت: از سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژينوزا بذر تهيه گرديد. سپس به دو گالن شيشه‌اي ۱۰ ليتري محتوي ۵ ليتر محيط کشت سنتتيک سودوموناس (۱۸)، ۵۰ ميلي‌متر

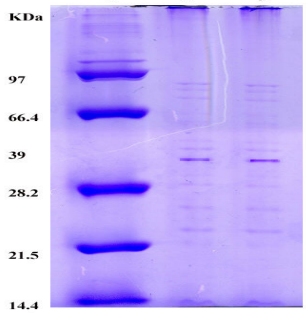
[1] - LPS
[2] - mOMPs
[3] - Stock

www.SID.ir

Archive of SID

بذر در شرايط كاملا استريل اضافه گرديد. گالن‌ها در دماي ۳۶±۱°C و دور ۱۲۰۰rpm (هم زن مغناطيسي) قرار گرفتند. در انتهاي فاز لگاريتمي رشد (تقريباً ۱۶ ساعت) و اطمينان از پاكي كشت، توده سلولي در ۶۰۰۰×g و دماي ٤°C به مدت ۹۰ دقيقه سانتريفوژ گرديد و توسط PBS (pH=۷/۲) سه بار شستشو شد.

استخراج و تخليص OMP-F: طبق روش پيشنهادي كلاسن و همكاران (۱۹۹۶)، با استفاده از دزاكسي كلات و اولتراسانتريفوژ افتراقي OMP-F استخراج و تخليص گرديد (۱۹). سپس با استفاده از روش SDS-PAGE الكتروفورز (لاميلا:۱۹۷۰) در ژل ۱۰٪ و به‌كارگيري ماركرهاي استاندارد با وزن ملكولي پايين درجه خلوص و سنجش و محاسبه



شكل ۱- الگوي SDS-PAGE الكتروفورز OMP-F وزيكول‌سودوموناس آئروژينوزا سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ در ژل ۱۰% ـ ستون ۱: ماركرهاي استاندارد با وزن ملكولي پايين ـ ستون ۲ و ۳ به ترتيب ۲ و ۴ ميكروگرم پروتئين OMP-F وزيكول

سنجش پروتئين: پروتئين OMP-F وزيكول بر اساس روش پيترسون (لوري اصلاح شده) مورد سنجش قرار گرفت (۲۰).

توان القاي سنتز آنتي‌بادي هيپرايميون در خرگوش: به يك گروه سه‌تايي از خرگوش سفيد نيوزلندي با وزن ۱/۵ الي ۲ كيلوگرم، ۵۰۰ ميكروگرم از OMP-F وزيكول سودوموناس آئروژينوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ به همراه ادجوانت فروند كامل به‌صورت داخل ماهيچه‌اي در روزهاي ۱، ۲۸، ۵۸ و ۱۴۸ تزريق گرديد. پس از يك هفته بعد از آخرين تزريق، خون هر يك از خرگوش‌ها از طريق قلب جمع‌آوري شده و آنتي‌سرم‌هاي OMP-F وزيكول مخلوط گرديدند. سپس واكنش رسوبي آنتي‌سرم هيپرايميون عليه OMP-F خالص طبق روش ژل ايمونوديفيوژن اخترلوني (۲۱) در آگاروز مورد ارزيابي قرار گرفت.

ايمن‌سازي غيرفعال: اين آزمون طبق روش گيللند و همكاران (۱۹۸۴) انجام گرفت (۲۲).

ايمن‌سازي فعال عليه سروتيپ‌هاي هموليگ و هترولگ: با استفاده از مدل حيواني پير و همكاران (۱۹۷۸)، توان حفاظتي فعال OMP-F وزيكول سودوموناس آئروژينوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ عليه سلول‌هاي زنده هموليگ و هترولگ مورد ارزيابي قرار گرفت (۲۳).

محاسبه LD۵۰: هر يك از ۱۶ سروتيپ سودوموناس آئروژينوزا جمع‌آوري شده از بيمارستان‌هاي تهران را به مدت ۱۸ ساعت در نوترينت آگار كشت داده، سلول‌ها توسط BS (pH=۷/۲) شسته شد. سپس تعليقي معادل ۰/۲ غلظت نوري در طول موج ۶۰۰ نانومتر از هر يك در PBS (۷/۲ =pH)تهيه گرديد.

LD۵۰ هر يك از سروتيپ‌ها با تزريق دوزهاي مختلفي از سلول‌هاي زنده به گروه سه‌تايي از موش به روش رد و مونچ (۱۹۳۸) محاسبه گرديد. به‌طوري كه ميانگين دو برابرLD۵۰ از ۱۶ سروتيپ سودوموناس آئروژينوزا تقريباً معادل$۱۰^{۸}$ ×۵ سلول زنده در ميلي‌ليتر بدست آمد (۷).

آزمون پيروژني: اين آزمون طبق روش پيشنهادي در گزارش فني سازمان جهاني بهداشت (۱۹۷۳) جهت اثبات عدم وجود احتمالي عوامل تب‌زا در OMP-F وزيكول خالص انجام پذيرفت (۲٤).

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون ايجاد حساسيت در پوست: طبق روش كريج (۱۹۶۵)، ايجاد حساسيت آني و يا تأخيري در پوست، با تزريق زيرجلدي ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ميكروگرم در ۰/۱ ميلي‌ليتر PBS (pH=۷/۲) از OMP-F وزيكول و مشاهده محل تزريق به مدت ٤، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسي قرار گرفت (۲۵).

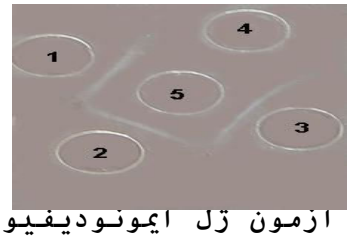
آزمون ايجاد سميت غيرنرمال: اين آزمون جهت تعيين بيزياني مصرف OMP-F وزيكول‌هاي خالص غشاي خارجي ديواره سلولي در خوكچه هندي و موش انجام گرديد.

نتايج

انتخاب سروتيپ مناسب سودوموناس آئروژينوزا جهت استخراج OMP-F: در تحقيق حاضر از بين ۱٦ سروتيپ سودوموناس آئروژينوزا سروتيپ CSBPI:۱٦-۱۹۰ كه با ۱۸/۹٤ درصد ابتلا از ۳۰۰ نمونه باليني، يكي از شايع‌ترين سروتيپ‌هاي پاتوژن در چهار بيمارستان تهران بوده و با آنتي‌سرم هموليزين سماتيك نيز در تيتر ۳۲۰ صد درصد واكنش آگلوتيناسيون (+٤) از خود نشان داد. جهت استخراج OMP-F وزيكول غشاي خارجي ديواره سلولي انتخاب گرديد.

الكتروفورز OMP-F در SDS-PAGE: چنانچه در شكل ۱ مشاهده مي‌گردد الگوي حركت الكتروفورزي OMP-F خالص شده به روش دزاكسي كلات (۱۹)، در ستون۲ و ۳ از ژل SDS-PAGE ۱۰٪ شامل يك باند در محدوده ۳۹-۳۷ كيلودالتون است كه OMP-F بوده و ستون ۱ ماركرهاي استاندارد با وزن ملكولي پايين است.

آزمون ايمونوديفيوژن در ژل آگارز: انتشار دوگانه OMP-F استخراج شده از سروتيپ ۱۹۰-CSBPI:۱٦ سودوموناس آئروژينوزا عليه آنتي‌سرم هيپرايميون خرگوش تهيه شده از آن، واكنش رسوبي مشخصي را در ژل آگاروز ايجاد نموده است (شكل ۲). اين آزمون توان القايي OMP-F در سنتز آنتي‌بادي هموليزين در بدن حيوان را نشان مي‌دهد.



شكل ۲- آزمون ژل ايمونوديفيوژن: چاهك شماره ۱، ۲، و ۳ (۵۰۰µg از OMP-F خالص)، چاهك شماره ۴ (۵۰۰µg از BSA به عنوان شاهد منفي)، چاهك شماره ۵ (سرم هيپرايميون خرگوش عليه OMP-F)

ايمن‌سازي غيرفعال: جدول ۱، توان حفاظتي تزريق ۰/۲۵ ميلي‌ليتر آنتي‌سرم OMP-F وزيكول سروتيپ CSBPI:۱٦-۱۹۰ را عليه ۲×LD۵۰ سلول زنده سروتيپ CSBPI:۱٦-۱۹۰ كه در موش‌هاي مورد آزمون ايجاد شده است را نشان مي‌دهد؛ در صورتي كه تزريق ميزان مشابهي از سرم نرمال خرگوش در گروه كنترل فاقد هرگونه واكنش حفاظتي عليه ۲×LD۵۰ سلول زنده سروتيپ۱۹۰-CSBPI:۱٦ مي‌باشد.

جدول ۱- ايمن‌سازي غيرفعال در موش با تزريق سرم هيپرايميون عليه ۲×LD۵۰سروتيپ CSBPI:۱٦-۱۹۰

گروه	دوز چلنج	تعداد زنده مانده	درصد زنده مانده	P-Value
آزمايش	۲×LD۵۰	۹:۱۰	%۹۰	۰/۰۰۱
كنترل	۲×LD۵۰	۰:۵	%۰	۰/۰۰۱

ايمن‌سازي فعال: جدول ۲ توان حفاظتي فعال OMP-F وزيكول را عليه ۲×LD۵۰ سروتيپ ۱۹۰-CSBPI:۱٦ و ۱۵ سروتيپ هترولگ سودوموناس آئروژينوزا را نشان مي‌دهد. چنانچه ملاحظه مي‌گردد تزريق داخل صفاقي۱۰ ميكروگرم OMP-F وزيكول استخراج شده از سروتيپ ۱۹۰-CSBPI:۱٦ به هر يك از موش‌هاي گروه اول در روزهاي ۱ و ۵ قادر است ۱۰۰ درصد ايمني

www.SID.ir

Archive of SID

حفاظتي عليه تزريق صفاقي ۲×LD۵۰ سلول زنده پس از يك هفته را ايجاد نمايد. به علاوه همين ميزان OMP-F وزيكول توانست بين ۵۰ الي ۱۰۰ درصد ايمني فعال حفاظتي عليه تزريق ۲×LD۵۰ از ۱۵ سروتيپ سودوموناس آئروژينوزا هترولگ نيز ايجاد نمايد.

در صورتي كه تزريق مشابه ۰/۱ ميلي‌ليترPBS (pH=۷/۲) در روزهاي ۱ و ۵ به موش‌هاي گروه شاهد فاقد هرگونه ايمني حفاظتي عليه تزريق داخل صفاقي ۲×LD۵۰سلول زنده از سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ مي‌باشد.

آزمون پيروژني: جهت مشاهده عدم وجود ناخالصي بيش از حد عوامل تبزا در OMP-F وزيكول، آزمون پيروژني در خرگوش طبق روش پيشنهادي در گزارش في سازمان جهاني بهداشت (۱۹۷۳) انجام پذيرفت (۲۴). نتايج نشان مي‌دهد كه تزريق داخل جلدي ۱۰۰ ميكروگرم (وزن پروتئين) از OMP-F وزيكول سودوموناس آئروژينوزا به ازاي يك كيلوگرم وزن خرگوش تغييري در ميانگين گرماي نرمال بدن حيوان ايجاد نمي‌نمايد.

آزمون ايجاد حساسيت در پوست: با توجه به نتايج حاصل از تزريق زيرجلدي ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ميكروگرم OMP-F وزيكول سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ به پوست خرگوش هيچگونه آسيبي به‌صورت حساسيت آني (پس از ۲ ساعت) و يا تأخيري (پس از ۷۲ ساعت) در پوست مشاهده نگرديد. به علاوه تزريق مجدد ۲۵ ميكروگرم OMP-F وزيكول به‌صورت داخل جلدي در محل ديگر نيز واكنش حساسيت پوستي (پديده شوارتزمن) را به‌دنبال نداشت. در صورتي‌كه با تزريق ۱×LD۵۰، ۲×LD۵۰، ۵×LD۵۰ از سلول زنده سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ صدمه‌هاي پوستي نسبتاً شديدي به‌صورت سرخي، تورم و خشكي پوست پس از ۲۴ ساعت ايجاد گرديد و در رقت‌هاي ۱۰×LD۵۰ و ۵۰×LD۵۰ سلول زنده سروتيپ فوق اين ضايعات به‌صورت نكروز بافت پوستي ظاهر گشت.

جدول ۲: ايجاد ايمني فعال در موش با تزريق OMP-F وزيكول استخراج شده از سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ عليه ۲×LD۵۰ سلول زنده سروتيپ هولگ و ۱۵ سروتيپ هترولگ سودوموناس آئروژينوزا

سويه چلنج	دوز چلنج	تعداد زنده مانده	درصد زنده مانده
CSBPI:۱-۱۰۱	۳ ×۱۰۸	۵:۱۰	۵۰
CSBPI:۲-۱۶۰	۳ ×۱۰۸	۸:۱۰	۸۰
CSBPI:۳-۱۲۷	۳ ×۱۰۸	۵:۱۰	۵۰
CSBPI:۴-۸۹	۶ ×۱۰۸	۸:۱۰	۸۰
CSBPI:۵-۶۰	۶ ×۱۰۸	۱۰:۱۰	۱۰۰
CSBPI:۶-۱۰۹	۵ ×۱۰۸	۵:۱۰	۵۰
CSBPI:۷-۱۰۷	۴×۱۰۸	۸:۱۰	۸۰
CSBPI:۸-۹۸	۵×۱۰۸	۷:۱۰	۷۰
CSBPI:۹-۱۰۵	۷×۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBPI:۱۰-۵۵	۴×۱۰۸	۷:۱۰	۷۰
CSBPI:۱۱-۱۰۶	۵ ×۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBPI:۱۲-۱۹۵	۳ ×۱۰۸	۱۰:۱۰	۱۰۰
CSBPI:۱۳-۱۰۸	۳ ×۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBPI:۱۵-۱۴	۵ ×۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBP1:۱۶-۱۹۰	۳ ×۱۰۸	۱۰:۱۰	۱۰۰
CSBPI:۱۷-۱۱۰	۶ ×۱۰۸	۶:۱۰	۶۰

آزمون ايجاد سميت غيرنرمال: نتايج نشان مي‌دهد كه تزريق داخل صفاقي ۵۰۰ ميكروگرم از OMP-F وزيكول سروتيپ۱۹۰-CSBPI:۱۶ سودوموناس آئروژينوزا به يك گروه پنجتايي از خوكچه هندي نه تنها مرگ‌ومير و يا كاهش وزن نرمال را در حيوان سبب نگرديده است بلكه نظير شاهد منفي PBS (pH=۷/۲) هيچگونه ضايعه‌اي نيز در محل تزريق و يا اعضاي داخلي حيوان پس از اتوپسي ايجاد نمي‌نمايد و نيز تزريق داخل صفاقي ۱۰۰ ميكروگرم از OMP-F وزيكول سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژينوزا به يك گروه

www.SID.ir

Archive of SID

پنجتايي از موش پس از ۷۲ ساعت سبب مرگ‌ومير و يا كاهش ميانگين وزني از موش‌ها نگرديده است.

بحث و نتيجه‌گيري

امروزه توان حفاظتي پروتئين‌هاي عمده غشاي خارجي (mOMPs) ديواره سلولي بسياري از باكتري‌هاي گرم‌منفي بيماريزا عليه عوامل اتيولوژيك مربوطه كاملاً به اثبات رسيده است (۱۵-۱۲ و ۲۶).

در اين مطالعه سروتيپ۱۹۰-CSBPI:۱۶ كه يكي از شايع‌ترين ايمونوتيپ‌هاي سودوموناس آئروژينوزا بومي در بيمارستان‌هاي تهران بوده و بيشترين واكنش آگلوتيناسيون را با آنتي‌سرم اختصاصي O از خود نشان مي‌دهد، به عنوان ايمونوژن مفيد و مؤثر در مدل موش مورد ارزيابي قرار گرفته است. بنابراين محور اصلي اين تحقيق بررسي ايمونولوژيكي و بي‌زياني مصرف OMP-F وزيكول سروتيپ ۱۹۰-CSBPI:۱۶ عليه سروتيپ هموLگ و ۱۵ سروتيپ هترولگ سودوموناس آئروژينوزا شايع در ايران است.

تحقيق حاضر نشان مي‌دهد كه تزريق داخل صفاقي ۵۰۰ ميكروگرم OMP-F وزيكول استخراج شده از سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ با وزن ملكولي ۳۷-۳۹ كيلودالتون (شكل ۱) در روزهاي ۱، ۲۸، ۵۸ و ۱۴۸ قادر است سيستم ايمني هومرال خرگوش را در القاي سنتز آنتي‌كر اختصاصي به‌طور قابل توجهي تحريك نمايد (شكل ۲). به‌طوري كه تزريق داخل صفاقي ۰/۲۵ ميلي‌ليتر از همان آنتي‌سرم هيپرايميون خرگوش در چهار نوبت به موش، توان حفاظتي مناسبي را عليه ۲LD۵۰× سلول زنده سودوموناس آئروژينوزا ۱۹۰-CSBPI:۱۶ ايجاد نمود (جدول ۱).

برخلاف LPS سودوموناس آئروژينوزا كه سيستم ايمني بدن حيوان را انحصاراً عليه سروتيپ هموLگ خود تحريك مي‌نمايد (۲۷)، موش‌هاي واكسينه با ۱۰ ميكروگرم OMP-F وزيكول ۱۹۰-CSBPI:۱۶ مقاومت قابل توجهي را عليه ۲LD۵۰× سلول زنده سروتيپ هموLگ و پانزده سروتيپ هترولگ سودوموناس آئروژينوزا از خود نشان دادند (جدول ۲). اين يافته نشان مي‌دهد كه علت اين واكنش متقاطع ايمونولوژيكي وجود اپي‌تيپ‌هاي مشترك مابين OMP-F وزيكول ديواره سلولي سروتيپ‌هاي مختلف سودوموناس آئروژينوزا مي‌باشد.

عدم وجود ناخالصي‌هاي پيروژنيك احتمالي در OMP-F استخراج شده به روش انتخابي از سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ نيز با انجام آزمون پيروژني در خرگوش مورد بررسي قرار گرفت، به‌طوري كه تزريق زيرجلدی ۱۰۰ ميكروگرم از OMP-F وزيكول به ازاي يك كيلوگرم وزن خرگوش سبب افزايش دماي نرمال بدن حيوان نگرديد. به علاوه در آزمون ايجاد حساسيت پوستي نيز تزريق زيرجلدي ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و حتي ۱۵۰ ميكروگرم از OMP-F وزيكول سروتيپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ فاقد هرگونه تحريك‌زايي در پوست خرگوش مي‌باشد. در صورتي‌كه تزريق داخل جلدي ۱LD۵۰×، ۲LD۵۰×، ۵LD۵۰×، ۱۰LD۵۰× و ۵۰LD۵۰×، سلول كشته شده سروتيپ ۱۹۰-CSBPI:۱۶ عارضه شديدي را در پوست خرگوش به‌علت وجود LPS در ديواره سلولي ايجاد نموده است.

در ادامه مطالعات حاضر، بي‌زياني مصرف OMP-F وزيكول نيز توسط آزمون ايجاد سميت غيرنرمال در موش و خوكچه هندي مورد ارزيابي قرار گرفت. به‌طوري‌كه از نتايج ملاحظه مي‌شود، با تزريق داخل صفاقي ۱۰۰

www.SID.ir

Archive of SID

ميكروگرم OMP-F وزيكول خالص به گروه پنجتايي موش و ٥٠٠ ميكروگرم به گروه پنجتايي خوكچه هندي، هيچگونه ضايعه‌اي در محل تزريق و اعضاي داخلي حيوانات پس از اتوپسي ايجاد نگرديد به علاوه ٧ روز بعد از تزريق، كاهش وزن و يا مرگ و مير نيز در بين حيوانات مشاهده نشد.

با ارزيابي داده هاي حاصل از تحقيق حاضر چنين مي‌توان نتيجه گرفت كه OMP-F وزيكول استخراج شده از سروتيپ CSBPI:١٦-١٩٠ سودوموناس‌آئروژينوزا توان حفاظتي قابل توجهي را نه تنها عليه عفونت ايجاد شده توسط سروتيپ هموگ CSBPI:١٦-١٩٠ در موش از خود نشان مي‌دهد بلكه قادر است حيوان را در مقابل عوارض ناشي از ساير ايمونوتيپ‌هاي ديگر سودوموناس آئروژينوزا محافظت نمايد. ضمناً تزريق OMP-F وزيكول خالص شده (به روش دزاكسي‌كلات- اولترا سانتريفوژ افتراقي) كاملاً بي‌زيان مي‌باشد.

اگرچه مصرف انساني OMP-F وزيكول به عنوان ايمونوژني مفيد و مؤثر به تحقيقات گسترده‌تري به‌ويژه انجام آزمون‌هاي سنجش كارايي و بي‌زياني درمدل انساني نيازمند است اما به‌نظر مي‌رسد OMP-F وزيكول ديواره سلولي سودوموناس آئروژينوزا CSBPI:١٦-١٩٠ را مي‌توان به عنوان كانديدي جهت توليد يك واكسن مفيد و مؤثر با طيف وسيع حفاظتي عليه عفونت‌هاي ناشي از سروتيپ‌هاي مختلف سودوموناس آئروژينوزا بومي ايران به‌كار برد.

References

1- Chen TY, Shang HF, Chen TL, et al. Recombinant protein composed of Pseudomonas exotoxin A, Outer Membrane Proteins I & F as vaccine against P. aeruginosa infection. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 52:524- 533.

2- Maschmeyer G, Braveny I. Review of the Incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. Eur J clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 915- 925.

3- Gang RK, Bang RL, Sanyal SC ,et al. *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in burns. Burns 1999; 25: 611-616.

4- Karimi Estahbanati H, Pour Kashani P, Ghanaatpisheh F, et al. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns 2002 ;28: 340- 348.

5- Rastegar lari A, Bahrami H, Alaghehbandan R. Pseudomonas infections in Tohid burn center, Iran. Burns 1998; 24: 637- 641.

6- Jang IJ, Kim IS, Park WJ, et al. Human immune response to a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine. Vaccine 1999;17:158-168.

7- Kim DK, Kim JJ, Kim JH, et al. Comparison two immunization schedules for a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins vaccine in burn patients. Vaccine 2001; 19: 1274-1283.

8- Alexander LW, Fisher MW. Immunization against Pseudomonas infection after thermal injury. J Infect Dis 1974; 130 (suppl): 152-158.

9- Roe EA, Jones RJ. Immunization of burned patients against *Pseudomonas aeruginosa* infection at safdarjang hospital, New Delhi. Review of Infectious Diseases. 1983; 5(Suppl.5): 5922-5930.

10- Cryz SJ, JR, Furer E, Cross AS, et al. Safety and immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* o-polysaccharide toxin. A conjugate vaccine in humans. J clin Invest 1987; 80: 51-56.

11- Von Specht BU, Lucking HC, Blum B, et al. Safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein I vaccine in human volunteers. Vaccine 1996; 14 (12): 1111-1117.

12- Tabaraie B, Sharma P, Ganguly NK, et al. Stimulation of macrophage oxygen free-radical production and lymphocyte blastogenic response By immunization with porins. Microbiol Immunol 1994; 36(7): 561-569.

13- Tabaraie B, Sharma BK, Sharma-Rishi P. Evaluation of salmonella porins as a broad spectrum vaccine candidate. Microbiol Immunol 1994; 38(7): 553-559.

14- Tabaraie B, Sharma P, Sharma BK. Evaluation of immunoprophilactic activities of purified porins of *Salmonella typhi* 0-901 and *Salmonella typhimurium* Ra-c. Vaccine 1992; 4:278-284.

www.SID.ir

Archive of SID

15- Tabaraie B, Nejati M, Ahmadi H, et al. Comparative characterization of porins from *Salmonella typhi* 0-901 & *Salmonella typhimurium* RA-30. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran 2000; 14(2): 161-168.

16- Robert EW, Hancock and CareyAM, Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: Heat-and 2-Mercaptoethano (-modifiable proteins. J Bacteriol 1979; 902-910.

17- Gilleland HE, JR, Gielland LB, Mathews –Greer JM. Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strain in rats. Infect Immun 1988; 56: 1017-1022.

18- Miller JM, Spilsbury JF, Jones RJ, et al. A new polyvalent Pseudomonas vaccine. J Med Microbiol 1977;10; 19-27.

19- Classen J, Meylis J, Van der Ley P, et al. Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. Vaccine 1996;14: 1001-1008.

20- Peterson GL, A simplification of the protein assay of Lowry, et al. which is more generally applicable. Anal Biochem 1977; 83:346-356.

21- Ouctherlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Prog Allergy 1962; 6:30-154.

22- Gilleland HE Jr, Parker MG, Mathews JM, et al. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. Infect Immun 1984;44: 49-54

23- Pier GB, Sidberry HF, Sadoff JC. Protective immunity induced in mice by immunization with high-molecular-weight polysaccharide from *pseudomonas aeruginosa*. J Clinical Investigation 1978; 69: 303-308.

24- WHO Technical Report. Series No. 530, 1973; pp: 48-52.

25- Craig JP. Preparation of The vascular permeability factor of *Vibrio cholera*. J Bacteriol 1965; 42: 793-798.

26- Calrac AM, Peeters IVO JTM. Immunogenicity of various presentation forms of Por-A outer membrane protein of *Neisseria meningitides* in mice. Vaccine 1999; 2702-2712.

27- Cryz SJJr, Furer E, Cross AS, et al. Role of Lipopolysaccharide in Virulence of *Pseudomonas aeruginosa.* Infect Immun 1984 508-513.

www.SID.ir