مجله دنیای میکروب‌ها
سال ششم شماره دوم (پیاپی ۱۵) تابستان ۱۳۹۲
صفحات ۱۴۷-۱۳۸

Original Article

ایمنی زایی کونژوگه آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* و توکسوئید دیفتری در موش

غزاله جابری[۱]، رضا شاپوری*[۲]، اشرف کریمی نیک[۳]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، [۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی، [۳] مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* از مهم ترین پاتوژن های عفونی در پزشکی به شمار می آید. این باکتری عفونت های مختلفی به ویژه در بیماران دچار سوختگی های شدید و افراد دارای نقص سیستم ایمنی ایجاد می نماید. این پژوهش با هدف تهیه ترکیب آنتی ژنی کونژوگه با قابلیت القای تولید آنتی بادی و ایمنی خاطره ای علیه *سودوموناس آئروژینوزا* در مدل موش انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت تجربی بر روی سویه PAO1 باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* انجام شد. در ابتدا باکتری در محیط اختصاصی کشت و آلژینات آن استخراج و تغلیظ گردید. سپس توکسوئید دیفتری، ADH و EDAC به عنوان مولکول فاصله گذار و مولکول اتصال دهنده اضافه شدند. محلول کونژوگه آلژینات و توکسوئید دیفتری از ستون کروماتوگرافی (CL-2B) عبور و آزمون های کنترل کیفی بر روی آن انجام شد. آنتی ژن تهیه شده به موش های نژاد BALB/c با میزان ۱۰ میکروگرم تزریق گردید. واکسیناسیون در سه دوز به صورت داخل صفاقی با فواصل دو هفته ای انجام و خون گیری دو هفته پس از هر تزریق صورت گرفت. سپس میزان آنتی بادی های سرمی برای IgG ، IgA و IgM با روش الایزا اندازه گیری شد.

یافته ها: آنتی بادی های سرمی گروه واکسینه شده با ALG-DT پس از هر تزریق افزایش معنی داری از لحاظ آماری داشتند. به طوری که میزان تیتر IgG تام، IgM و IgA تولید شده علیه آلژینات در گروه های واکسینه با کونژوگه نسبت به آلژینات خالص در سه تزریق به ترتیب به طور متوسط ۳/۵، ۱/۷ و ۱/۲ برابر افزایش نشان داد.

نتیجه گیری: افزایش تیتر آنتی بادی در گروه های واکسینه با کونژوگه آلژینات نشان دهنده فعال شدن سلول های T و ایجاد خاطره ایمنی می باشد. بنابراین کونژوگه آلژینات و توکسوئید دیفتری می تواند کاندید مناسبی به منظور تهیه واکسن باشد.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، آلژینات، توکسوئید دیفتری، واکسن کونژوگه، الایزا.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۱ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۱

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) از مهم ترین باکتری های بیماری زا در انسان به شمار می آید (۱). این باکتری در افراد با سیستم ایمنی ضعیف می تواند موجب عفونت های مختلف و به دنبال آن مرگ و میر بالا گردد (۲). از جمله این عفونت ها می توان به باکتریمی ناشی از سوختگی یا نوتروپنی اشاره نمود که از طریق جراحت های پوستی و شکستگی های باز وارد خون بیماران شده و عفونت های ثانویه متعددی را به وجود می آورد (۳). ذات الریه حاد، عفونت دستگاه تنفس، عفونت استخوان و مفاصل، عفونت ادراری در

* آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۲۳۲۵۵۳۶۴ پست الکترونیک: rezashapoury@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

افراد دارای سوند، التهاب پوست، اندوکاردیت، بیماری های ناشی از ضعف سیستم ایمنی مانند ایدز و سرطان، از دیگر بیماری های ایجاد شده توسط این باکتری می باشد. با توجه به تشکیل بیوفیلم و استقرار باکتری در دستگاه های تنفس مصنوعی، می توان انتظار طیف وسیعی از عفونت ها به ویژه در افراد بستری شده به دلایل شکستگی، سوختگی را داشت (۴). عوامل بیماری زای ترشحی *سودوموناس* شامل پیوسیانین، پیووردین، آلکالین پروتئاز، پروتئاز IV، الاستاز، فسفولیپاز C، رامنولیپید، اگزوتوکسین A و عوامل بیماری زای سطحی سلول شامل فلاژل، پیلی، لیپوپلی ساکارید (LPS) و آلژینات می باشند. کپسول پلی ساکاریدی این باکتری از جنس آلژینات است و ساخت آن در ریه بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس تحریک می گردد (۵). به دلیل حضور سویه های تولید کننده آلژینات در مبتلایان به سیستیک فیبروزیس، این بیماری در ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد می تواند به سمت عفونت های تنفسی پیشرفت کند (۶). از دیگر عملکردهای بیماری زایی آلژینات در سویه های موکوئیدی این باکتری می توان به مهار و تداخل مستقیم فاگوسیتوز، مقاومت آنتی بیوتیکی، تشکیل بیوفیلم، جلوگیری از کموتاکسی لکوسیت ها، کسب رادیکال های آزاد سمی، تولید آنتی بادی از طریق عملکرد اجوانتی، تحریک پاسخ لکوسیت های جند هسته ای، تسهیل فعالیت کمپلمان، اتصال به موسین ها، افزایش رادیکال های اکسیژن سمی و شکل گیری میکروکلنی باکتریایی در شرایط زنده اشاره نمود (۷).

با وجود شناخت گسترده *سودوموناس*، میزان مرگ در افراد مبتلا به این باکتری حدود ۵۰ درصد و دوره کمون بیماری معمولاً بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت می باشد. با توجه به مقاومت ذاتی به آنتی بیوتیک و نیز انتشار گسترده، این باکتری می تواند در شرایط متفاوت درگستره ای از میزبان های حساس زنده بماند. همچنین *سودوموناس* شایع ترین پاتوژن شناخته شده در بیمارانی است که بیش از یک هفته در بیمارستان بستری شده اند (۸). به منظور درمان عفونت های شدید ناشی از این باکتری، آنتی بیوتیک های گوناگونی مانند آمینوگلیکوزیدها، کینولون ها و بتالاکتام ها مورد استفاده قرار می گیرند. با این وجود شیوع سویه های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو و نیز مقاوم به کارباپنم ها به طور روز افزون از سراسر دنیا گزارش می گردد (۹).

اگرچه نقش آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* در ایجاد مصونیت علیه بیماری های سودوموناسی مشهود است اما پاسخ ایمنی نسبت به این آنتی ژن همانند سایر پلی ساکارید ها وابسته به سلول T نمی باشد (۱۰). در چند دهه اخیر محققین پی بردند که مولکول های کوچکی که هاپتن نامیده می شوند را می توان پس از کونژوگه کردن به مولکول های حامل پروتئینی، ایمونوژن نمود (۱۱). در نسل جدید تر واکسن های زیر واحدی که به صورت کونژوگه یک حامل پروتئینی با یک آنتی ژن پلی ساکاریدی تهیه می شوند، مانند واکسن های پروتئینی به صورت آنتی ژن وابسته به تیموس درآمده و سبب ایجاد ایمنی خاطره ای به دلیل فعال کردن لنفوسیت های T و B می شوند. به منظور افزایش تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن آلژینات در بدن و بهبود ایمنی هومورال و ایجاد یک ایمنی مناسب وابسته به سلول های T می توان پلی ساکارید کپسولی را با یک پروتئین حامل مناسب کونژوگه نمود (۱۲).

هدف از این پژوهش، اتصال کووالانسی اگزوپلی ساکارید آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* به توکسوئید دیفتری (ALG-DT) به منظور بالا بردن سطح ایمنی ایجاد شده توسط آلژینات و نیز بررسی میزان تحریک تولید آنتی بادی های IgG، IgA و IgM ضد *سودوموناس* توسط کونژوگه ALG-DT بود.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه مواد مورد نیاز: این مطالعه به صورت تجربی بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* سویه PAO1 و توکسوئید دیفتری تهیه شده از مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان انجام شد. ۶۰ سر موش ماده ۶ تا ۸ هفته ای از نژاد BALB/c و ۱۰ سرخرگوش از موسسه

Archive of SID
www.SID.ir

تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید. محیط کشت های تایوگلیکولات، نوترینت آگار، بلاد آگار، مک کانکی آگار، سابرو دکستروز آگار از شرکت Merck، کیت PyroMed از شرکت CoaChrom، آنتی بادی های Goat mouse IgGs از شرکت R & D، EDAC (1- Ethyl-3-(3-Dimenthylaminoprophyl) Carbodimide) و ADH (آدیپک اسید دی هیدرازید) و سایر مواد مورد نیاز نیز از شرکت SIGMA تهیه گردیدند.

ب) استخراج آلژینات: در ابتدا چند کلنی از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* از محیط نوترینت آگار به محیط کشت انتخابی حاوی گلیسرول، دکستروز، L– گلوتامین، Na_2HPO_4، K_2HPO_4، $MgSO_4.7H_2O$ تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۲۵۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل دور ریخته شد و آلژینات موجود در عصاره سلولی توسط اتانول سرد ترسیب گردید. روماند به دست آمده از مرحله قبل با حجمی معادل ۳ برابر اتانول سرد ۱۰۰٪ مخلوط و یک شبانه روز در یخچال نگهداری گردید. سپس با دور ۲۵۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و اتانول مطلق سرد، مجدداً ترسیب شد. سپس رسوب حاصل واجد آلژینات تخلیص و تغلیظ شده، با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی در ویال های استریل تقسیم گردید (۱۳).

ج) آزمون های کنترل کیفی: آلژینات استخراج شده از نظر عدم تب زایی به کمک آزمون تب زایی در خرگوش، سنجش میزان پروتئین به روش برادفورد و سنجش میزان اسید نوکلئیک با دستگاه اسپکتروفتومتری، در محدوده نرمال مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

د) تهیه محلول کونژوگه آلژینات سودوموناس آئروژینوزا با توکسوئید دیفتری: به ۱۰ میلی گرم آلژینات دپلی مریزه شده از مرحله قبل ۰/۵ مولار ADH و ۰/۵ مولار بی کربنات اضافه و به مدت ۱۸ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس ۰/۱ میلی گرم از ماده فاصله گذار EDAC به ازای هر میلی گرم پروتئین مصرفی به محلول اضافه و پس از مخلوط سازی بر روی یخ، یک شبانه روز در یخچال نگهداری شد. در نهایت ترکیب حاصل سه بار در برابر آب مقطر آپیروژن با کیسه دیالیزهایی با کاتاف ۱۰ کیلو دالتون دیالیز گردید (۱۴).

ه) جمع آوری بخش حاوی مولکول کونژوگه: در ابتدا ستون حاوی ژل سفاروز CL-2B با محلول کلرید سدیم ۰/۲ مولار شستشو و محلول اصلی کونژوگه از ستون عبور داده شد. بخش های جمع آوری شده در دو طول موج ۲۱۰ نانومتر (برای تشخیص پلی ساکارید ها) و ۲۸۰ نانومتر (برای تشخیص پروتئین ها) قرائت و لوله هایی که بیشترین جذب را در هر دو طول موج داشتند به عنوان بخش های حاوی مولکول کونژوگه جمع آوری و ادغام گردیدند (۱۵).

سپس کونژوگه های تهیه شده با کمک اولتراسانتریفوژ، تغلیظ و از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شدند. این محلول به کمک آزمون های کنترل کیفی انتشار دو گانه در ژل، تب زایی در خرگوش، توکسیسیته و استریلیتی مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

ز) واکسیناسیون و سنجش آنتی بادی های سرمی در موش: ۶۰ سر موش BALB/c به چهار گروه مساوی تقسیم شدند. گروه اول برای تزریق آنتی ژن کونژوگه، گروه دوم برای تزریق آلژینات خالص، گروه سوم برای تزریق توکسوئید دیفتری و گروه چهارم به عنوان شاهد (با تزریق نرمال سالین) مورد بررسی قرار گرفتند. واکسیناسیون سه بار با فواصل هر دو هفته یک بار به صورت داخل صفاقی انجام شد (۱۰ میلی گرم به ازای هر موش). خون گیری از قلب موش ها با فواصل دو هفته ای پس از هر تزریق (هر بار از پنج موش) انجام گرفت. سپس سرم خون ها به وسیله سانتریفیوژ جداسازی گردید و تست الایزا برای تعیین میزان آنتی بادی های سرمی IgG، IgA و IgM صورت گرفت (۱۷).

ح) آزمون های آماری: به منظور بررسی اختلاف تیترهای سرمی گروه های دریافت کننده آنتی ژن های مختلف در مقایسه با گروه کنترل، از آزمون آماری یک طرفه ANOVA و Tukey استفاده شد ($p< ۰/۰۱$) (۱۳).

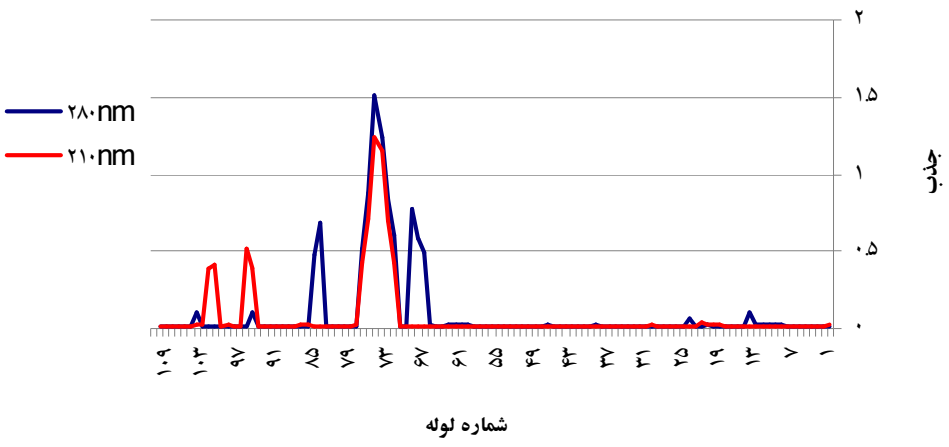
Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها

الف) آزمون های کنترل کیفی مربوط به جداسازی آلژینات و تهیه کونژوگه: در این مطالعه میزان آندوتوکسین موجود در نمونه ۰/۱۲۵ EU/ml محاسبه گردید. که با توجه به مجاز بودن نمونه برای مصارف زیستی (برای مصارف انسانی حد مجاز فعالیت آندوتوکسینی کمتر از ۵ EU/ml است)، این میزان قابل قبول می باشد. برای تعیین میزان پروتئین موجود در آلژینات از روش برادفورد و در هر گرم پلی ساکارید خشک محاسبه گردید. میزان قابل قبول پروتئین در پلی ساکارید طبق استاندارد این کیت ۱۰ میلی گرم به ازای هر یک گرم پروتئین می باشد. میزان اسید نوکلئیک موجود در پلی ساکارید کم تر از ۱/۴ میکروگرم در هر گرم پلی ساکارید محاسبه گردید که تا میزان کمتر از ۲۰ میکروگرم قابل قبول می باشد. در نمودار ۱، اولین پیک شامل سنگین ترین مولکول پروتئین یعنی DT-DT است که سریع تر از سایر مواد از ستون خارج شده است. دومین پیک در هر دو طول موج هم خوانی دارند و شامل مولکول کونژوگه حاصل می باشد. سومین پیک مربوط به مولکول پروتئینی DT است. پیک بعدی نشان دهنده مولکول ALG-ALG و آخرین پیک شامل سبک ترین مولکول یعنی آلژینات می باشد. بخش های پیک مولکول کونژوگه (لوله های ۷۲ تا ۷۷) تحت آزمون های کنترل کیفی قرار گرفتند. میزان اسید نوکلئیک موجود در کونژوگه به روش اسپکتروفتومتری UV اندازه گیری گردید که میزان اسید نوکلئیک کم تر از ۱/۴ میکروگرم در هر گرم پلی ساکارید محاسبه شد که این مقدار قابل قبول می باشد. کونژوگه تهیه شده با آزمون تب زایی ارزیابی شد. پس از ۲۴ ساعت نتایج نشان داد که افزایش درجه حرارت در هر سه خرگوش کم تر از ۱/۲ میکروگرم و در هر خرگوش کم تر از ۰/۵ میکروگرم می باشد. بنابراین نمونه های کونژوگه تهیه شده عاری از ماده تب زا بود و قابل تزریق می باشند. به منظور سنجش سمی یا غیر سمی بودن مولکول های کونژوگه تهیه شده، طبق روش استاندارد نمونه ها به ۵ موش تزریق و به مدت ۷ روز ارزیابی گردیدند. عدم مشاهده مرگ و میر در حیوانات مورد بررسی نشان دهنده غیر سمی بودن محلول کونژوگه می باشد. همچنین این محلول بر روی محیط های تایوگلیکولات، نوترینت آگار، بلاد آگار، مکانکی آگار و سابرو دکستروز آگار کشت داده شد و در شرایط بی هوازی و هوازی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت و محیط قارچی پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری مورد بررسی قرار گرفت. عدم رشد میکروارگانیسم ها، نشانه دهنده استریل بودن و تایید این آزمون بود.

ب) تیتر آنتی بادی های سرمی در مدل حیوانی: موش های BALB/c با دوز ۲/۵ میکروگرم هر ۱۴ روز طی سه مرحله واکسینه شدند. خون گیری و بررسی عیارآنتی بادی



نمودار ۱: جذب حاصل از ستون کروماتوگرافی برای جداسازی مولکول کونژوگه

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱: میزان تیتر آنتی بادی سرمی IgG پس از تزریق های اول، دوم و سوم

IgG	دو هفته پس از تزریق اول	دو هفته پس از تزریق دوم	دو هفته پس از تزریق سوم
ALG-DT**	۳۸۸*	۱۱۸۴*	۱۸۹۰*
ALG	۱۱۱*	۴۰۰*	۴۲۱*
DT	۰	۰	۰
کنترل	۰	۰	۰

* اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل با (p<۰/۰۱)

** ALG = آلژینات، DT = توکسئید دیفتری

جدول۲: میزان عیار آنتی بادی سرمی IgM پس از تزریق های اول، دوم و سوم

IgM	دو هفته پس از تزریق اول	دو هفته پس از تزریق دوم	دو هفته پس از تزریق سوم
ALG-DT**	۱۳۹*	۲۷۶*	۷۳۰/۲*
ALG	۱۱۶*	۲۲۹*	۲۵۲*
DT	۰	۰	۰
کنترل	۰	۰	۰

* نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل با (p<۰/۰۱)

** ALG = آلژینات، DT = توکسئید دیفتری

جدول۳: میزان تیتر آنتی بادی سرمی IgA پس از تزریق های اول، دوم و سوم

IgA	دو هفته پس از تزریق اول	دو هفته پس از تزریق دوم	دو هفته پس از تزریق سوم
ALG-DT**	۲۴/۶*	۳۵*	۴۱*
ALG	۲۳*	۲۵*	۲۹/۲*
DT	۰	۰	۰
کنترل	۰	۰	۰

* نشان دهنده اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل با (p<۰/۰۱)

** ALG = آلژینات، DT = توکسئید دیفتری

Archive of SID

های مختلف هر دو هفته یکبار به وسیله تست الایزا انجام شد. تمامی گروه های واکسینه شده با محلول کونژوگه آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* و توکسوئید دیفتری (ALG-DT) و توکسوئید دیفتری (DT) نسبت به گروه های کنترل، در دو هفته پس از تزریق اول، دوم و سوم از نظر میزان تیتر آنتی بادی سرمی اختلاف معنی داری را نشان دادند (جداول ۱ تا ۳) (p<۰/۰۱).

بحث

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان دومین باکتری بیماری زای رایج در جراحی ها و سومین عامل شایع عفونت های بیمارستانی محسوب می گردد. این باکتری پس از *اشرشیاکلی* (*E. coli*) و *استافیلوکوکوس* (*Staphylococcus*) ، حدود ۱۰٪ عفونت های بیمارستانی را تشکیل می دهد (۱۷). ماهیت طبیعی و اکتسابی این ارگانیسم در مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها موجب شده

www.SID.ir

که محققین به دنبال روش های نوینی برای درمان و پیش گیری از عفونت های ناشی از این باکتری باشند. از سال ۱۹۶۰ تاکنون استفاده از روش های ایمونولوژیک به عنوان یک روش مهم و اساسی در درمان مورد توجه قرار گرفته است (۱۸).

بررسی ها نشان داده است که با روش آمیداسیون می توان یکی از پایدارترین انواع مولکول های کونژوگه را ایجاد نمود. با کونژوگه کردن توکسوئید دیفتری به عنوان یک بخش پروتئینی به آلژینات دتوکسیفای *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان بخش پلی ساکاریدی، با روش آمیداسیون، می توان واکسنی تولید نمود که پتانسیل بالایی در حفاظت طولانی و پایدار بزرگسالان و خردسالان در برابر عفونت های مزمن ریوی، سیستیک فیبروزیس، سوختگی ها، افراد با نقص سیستم ایمنی و پنومونی ها داشته باشد (۱۹). دلیل انتخاب توکسوئید دیفتری و کونژوگه آن با آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا*، تهیه یک ترکیب ایمونوژن با کارآیی مناسب علیه بیماری های سودوموناسی، استفاده از خواص پروتئینی توکسوئید دیفتری به عنوان پروتئین حامل برای مولکول پلی ساکاریدی و استفاده از خواص اجوانتی آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* برای القای ایمنی بیشتر نسبت به توکسوئید دیفتری می باشد (۲۰).

در چند دهه اخیر واکسن های کونژوگه متعددی به منظور القای حفاظت علیه پاتوژن های حامل بخش پلی ساکاریدی طراحی شده است. به عنوان نمونه، در دهه ۱۹۶۰ تعدادی از واکسن ها در سطح آزمایشی توسعه یافتند و توسط جرالد پیر (Gerald Pier) برای پیش گیری از عفونت های سودومونائی در بیماران سوختگی تست شدند (۱۲). نجفیان (Najafian) و شریفی (Sharifi) در سال ۲۰۱۱ مطالعه ای بر روی ایمنی زایی کونژوگه آلژینات و LPS دتوکسیفای *سودوموناس آئروژینوزا* با توکسوئید کزاز در موش نژاد BALB/c انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که عیار آنتی بادی های IgM، IgA و IgG تولید شده علیه آلژینات و LPS در حالت کونژوگه نسبت به حالت خالص در هر سه تزریق به طور متوسط دو تا سه برابر افزایش می یابد (۲۱). در مطالعه حاضر نیز تیتر آنتی بادی های تولیدی بر علیه آلژینات به صورت کونژوگه بیش از آلژینات خالص بود. به طوری که میزان تیتر IgG تولید شده در سه تزریق به طور متوسط ۳/۵ برابر افزایش نشان داد. IgM ایمونوگلوبولین اصلی در پاسخ اولیه است و از موثرترین ایمونوگلوبولین ها در آگلوتیناسیون و تثبیت سیستم کمپلمان محسوب می شود (۲۲). در مطالعه حاضر تیتر IgM تولیدی بر علیه آلژینات در گروه های واکسینه با ALG-DT در تزریق سوم نسبت به تزریق اول، از ۱۳۹ به ۷۳۰/۲ افزایش نشان داد (جدول ۱). IgA عمده ترین آنتی بادی است که در بافت های مخاطی لنفاوی تولید می گردد و از سلول های پوششی مخاطی به داخل مجاری ترشح می شود. در این پژوهش، IgA تولیدی علیه آلژینات دو هفته پس از دومین دوز تزریقی در گروه های واکسینه با ALG-DT به طور غالب مشاهده شد. هم چنین آنتی بادی IgG تولیدی پس از القای آلژینات نقش موثری در پیش گیری از عفونت زخم های سوختگی ناشی از *سودوموناس آئروژینوز* نشان داد و در تزریق سوم نسبت به تزریق اول میزان آن از ۴۲۱ به ۱۸۰۹ افزایش داشت. در دهه های اخیر، تحقیقات گسترده ای بر روی بررسی تیتر آنتی بادی های تولید شده علیه واکسن های کونژوگه انجام شده است. کریز (Cryz) و همکاران در سال ۱۹۸۶، پلی ساکارید مشتق شده از LPS *سودوموناس آئروژینوزا* را با توکسوئید کزاز کونژوگه نمودند. در این روش از ADH به عنوان مولکول فاصله گذار و از EDAC به عنوان عامل جفت کننده استفاده شد. این محققان با واکسیناسیون داوطلبان با کونژوگه فوق مشاهده کردند که میزان تیتر آنتی‌بادی IgG تولید شده علیه LPS ۱۹ برابر بود. در ۸۲٪ از داوطلبان افزایش در میزان تیتر آنتی بادی ها بیش از ۴ برابر نشان داده شد و میزان تیتر آنتی بادی علیه توکسوئید کزاز در ۵۶٪ موارد بیش از ۴ برابر افزایش داشت (۲۳). میدوینتر (Midwinter) و همکاران در سال ۱۹۹۰ دریافتند که ایمنی زایی اندک پلی ساکارید را می توان توسط کونژوگه کردن با توکسوئید دیفتری برطرف نمود. برای این منظور آنها بخش پلی ساکارید از لیپوپلی ساکارید باکتری *لپتوسپیرا اینتروگانس* (*Leptospira interrogans*) را با توکسوئید دیفتری کونژوگه کردند. نتایج آنها در موش ها

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش حداقل ۱۰ برابری تیتر آنتی‌بادی ها در گروه های واکسینه با کونژوگه PS-DT را نسبت به گروه های واکسینه با LPS خالص نشان داد (۲۴). بهزادیان نژاد (Behzadiannejad) و همکاران در سال ۱۹۹۹ پلی ساکارید O مشتق شده از LPS *سودوموناس آئروژینوزا* را با روش اکسیداسیون پریودات با توکسوئید کزاز کونژوگه نمودند. بررسی تیتر آنتی بادی های تولید شده بر علیه LPS در خرگوش های ایمن شده با پلی ساکارید O و کونژوگه پلی ساکاریدO- TT نشان داد که دو هفته پس از آخرین تزریق، عیار آنتی بادی در خرگوش های ایمن شده با کونژوگه، ۴ برابر تیتر آنتی بادی در خرگوش های ایمن شده با پلی ساکارید O خالص می باشد. در خرگوش هایی که با مولکول کونژوگه ایمن شده بودند بر علیه توکسوئید کزاز نیز آنتی بادی تشکیل شده بود (۱). در تحقیق حاضر میزان تیتر آنتی‌بادی های تولید شده برعلیه آلژینات نیز در گروه های واکسینه با کونژوگه بیش تر از آلژینات خالص بود. به طوری که میزان تیتر IgG تام تولید شده علیه آلژینات در گروه های واکسینه با کونژوگه نسبت به آلژینات خالص در سه تزریق به طور متوسط ۳/۵ برابر افزایش نشان داد. این یافته با نتایج به دست آمده در پژوهش های ذکر شده هم خوانی دارد. در این مطالعه، کونژوگاسیون توکسوئید دیفتری به عنوان یک حامل پروتئینی با آلژینات از طریق روش آمیداسیون واکسنی تولید کرده است که پتانسیل بالایی برای حفاظت طولانی و پایدار نسبت به آلژینات خالص داشته و سبب فعال شدن لنفوسیت های T کمکی (T-helper) می گردد. ایمنی ایجاد شده توسط سلول های T، خاطره ایمنی ایجاد می نماید که قادر است حفاظت پایدار و طولانی در برابر بیماری های سودوموناسی داشته باشد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان تیتر آنتی بادی های سرمی در گروه واکسینه شده با محلول کونژوگه آلژینات و توکسوئید دیفتری بسیار بالاتر از گروه واکسینه شده با آلژینات به تنهایی می باشد. از این رو ترکیب کونژوگه می تواند کاندید مناسبی به منظور تهیه واکسن در برابر عفونت های سودوموناسی در موش محسوب گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Behzadian-Nejad Q, Hoseinzadeh H, Moazeni M. Purification of lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* and conjugation of O-polysaccharide to tetanus toxoid and determination level of antibodies. Modares J Med Sci. 1999; 2(1): 13-17. [In Persian]

2. Pena C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Grandados A, Calbo E, Rodriguez-Bano J, Rodriguez F, Tubau F, Oliver A. Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* blood stream infections: a post Hoc analysis of a prospective cohort. Clin Infect Dis. 2013; 57(2): 208-216.

3. Schumann J, Bluethmann H, Tiegs G. Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A with endotoxin, superantigen, or TNF results in TNFR1- and TNFR2- dependent liver toxicity in mice. Immuno Lett. 2000; 74(2): 165-172.

4. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection:

Archive of SID
www.SID.ir

lessons from a versatile opportunist. Microb Infect. 2000; 2(9): 1051-1060.

5. Fogle MR, Griswold JA, Oliver JW, Hamood AN. Anti-ETA IgG neutralizes the effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. J Surg Res. 2002; 106(1): 86-98.

6. Murray RGE, Holt JG, Krieg NR. Sneath PHA. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore. 2001.

7. Michalkiewicz J, Stachowski J, Barth C, Patzer J, Dzierzanowska D, Madalinski K. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on IFN-synthesis: expression of co-stimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. Immunol Lett. 1999; 69(3): 359-366.

8. Manafi A, Kohanteb J. Active immunization using exotoxin A confers protection against *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn model. BMC Microbiol. 2009; 9(23): 1-5.

9. Sun Z, Jiao X, Peng Q, Jiang F, Huang Y, Zhang J, Yao F. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. Cell Physiol Biochem. 2013; 31(2-3): 347-354.

10. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect. 2006; 36(2): 78-91.

11. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology, 5th ed, Elsevier Inc. 2003.

12. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Losa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exo-polysaccharide-alginate conjugate vaccine. Infect Immun. 2003; 71: 3875-3884.

13. Shapouri R. 2005. Evaluation of immune responses of *Brucella abortus* detoxified lipopolysacharide and polysaccharide-O conjugates to tetanus toxoid. Ph. D. Tarbiat Modarres University. Iran. [In Persian]

14. Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najar-Peerayen SH, Mousavi-Hosseini K, Moazeni M, Rezvan H, Adib-Motlagh B. Preliminary investigation on the isolation of alginate produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Ann Mic. 2005; 55(4): 279-282.

15. Jr SJC, Furer E, Sadoff JC, Germanier *R. Pseudomonas aeruginosa* immunotype 5 polysaccharide -toxin A conjugate vaccine. Infect Immune. 1986; 52(1): 161-165.

16. Govan JR, Sarasola P, Taylor DJ, Tatnell PJ, Russell NJ, Gacesa P. Isolation of a mucoid alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain from the equine guttural pouch. J Clin Microbiol. 1992; 30(3): 595-599.

17. Michel Briand Y, Baysse C, Christine B. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie. 2002; 84(5-6): 499-510.

18. Holder IA. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. Vaccine. 2004; 22(7): 831-839.

19. Winstanley C, Coulson MA, Wepner B, Morgan JA, Hart CA. Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. 1996; 142(8): 2145-2151.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Bayer AS, Eftekhar F, Tu J, Nast CC, Speert DP. Oxygen dependent up-regulation of mucoid exopolysacharide (alginate) production in *Pseudomonas aeruginosa.* Infect. Immun. 1990; 58: 1344-1349.

21. Najafian M. 2011. Immunological evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate conjugated to tetanus toxoid in mice as a vaccine candidate. M.Sc. Zanjan Branch. Islamic Azad University. Iran. [In Persian]

22. Siegrist C. Vaccination in the neonatal period and early infancy. Int rev immunol. 2000; 19 (2–3): 195-219.

23. Cryz SJ, Sadoff JC, Furer E, Germanier R. *Pseudomonas aeruginosa* polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine: Safety and immunogenicity in humans. J Infect Dis. 1986; 154(4): 682-688.

24. Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. J Med Microbiol. 1990; 33(3): 199-204.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 6, No. 2, June 2013

Original Article

Immunization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate - conjugated to diphteria toxoid in mice

Ghazaleh Jaberi[1], Reza Shapouri[2], Ashraf Kariminik[3]

[1] M.Sc., Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

[3] Lecturer, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important infectious agent in medicine. These bacteria cause several infections especially in the patient with high degrees of burns and in immunodeficiency cases. The purpose of this study was providing conjugated antigen component that can induct production of antibody and memory immune in mouse model against *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods: After culturing *P. aeruginosa* strain PAO1 and extraction of alginate, Diphteria toxoid, ADH and EDAC were added as protein carrier, spacer and linker, respectively to the alginate. After passing the Alginate diphtheria toxoid conjugated (ALG-DT) through chromatography column (CL-2B), its quality was checked to get the quality control label. The prepared antigens were intraperitoneally injected to BALB/c mice (10µg/ml/mouse) for three times once each two weeks. Blood sampling was performed after two weeks of each injection and the levels of serum IgG, IgA and IgM were measured by ELISA.

Results: The titer of serum antibodies of vaccinated group with ALG-DT increased significantly after each injection. The levels of serum IgG, IgM and IgA against alginate in vaccinated group was significantly more than the control groups, and after third injection reached to 3.5, 1.7 and 1.2 times increases, respectively.

Conclusion: The increases in the levels of antibodies in vaccinated groups are an indicator of activation of T-cells and memory cells. As a result, the conjugated alginate-diphtheria toxoid can be appropriate candidates for production of vaccine.

Keywords: *Pseudomonas aeroginosa*, Alginate, Diphtheria toxoid, Conjugate vaccine, ELISA.

Correspondance to: Reza Shapouri

Tel: +989123255364

E-mail: rezashapoury@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 6(2): 138-147.

Archive of SID

www.SID.ir