Archive of SID

ارزیابی فعالیتهای بیولوژیک و ایمنولوژیک لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس

ایرج پاکزاد*[۱] ، عباس رضایی [۲] ، محمد جواد رسایی[۳] ، احمد زواران حسینی[٤] ، انوشیروان کاظم نژاد[٥] ، بهمن تبرایی [٦] ، سعید ریوندی[۷]

۱) گروه میکروب شناسی ، دانشکده پیرا پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

۲) گروه میکروبشناسی ، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس

۳) گروه بیوتکنولوژی ، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس

۴) گروه ایمنی شناسی ، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس

۵) گروه آمار حیاتی ، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس

۶) بخش واکسنهای باکتریال ، انستیتو پاستور ایران

۷) شرکت پژوهش و پالایش خون – سازمان انتقال خون ایران

تاریخ دریافت : ۸٤/۱۱/۲۹ **تاریخ پذیرش : ۸٦/۳/۱۸**

چکیده

مقدمه : لیپوپلی ساکارید (LPS) بروسلا آبورتوس در تشخیص بیماری تب مالت (بروسلوزیس) و بعنوان یکی از اجزای واکسن زیر واحدی بر علیه این بیماری حائز اهمیت است . بررسی فعالیت بیولوژیک لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس و میزان حفاظت بخشی آن هدف این تحقیق است .

مواد و روش ها : LPS. بروسلا آبورتوس با روش ان _ بوتانل استخراج و با روش اولترا سانتریفوژ خالص گردید . لیپوپلی ساکارید بروسلا با تیمار قلیائی سم زدایی شد . میزان سمیت LPS بروسلا در قیاس با شکل سم زدایی شده آن به روش LAL(Limulus Amoebocyte Lysate) و تب زایی در خرگوش بررسی شد . ارزیابی ایمنولوژیک آن در مدل حیوانی با تعیین تیتر آنتی بادی و میزان حفاظت بخشی آن صورت گرفت .

یافته های پژوهش : نتایج نشان داد که مقدار آلودگی پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک به ترتیب کمتر از ۲٪ و ۱٪ بود . آزمایش تب زایی با ۱۰µg/ml لیپو پلی ساکارید بروسلا آبورتوس و ۵µg/ml/ لیپوپلی ساکارید E.coli مثبت و در مقادیر ۱۰µg/ml و ۵۰ از لیپوپلی ساکارید سم زدایی شده (D-LPS) منفی بود . آزمایش LAL با ۱۰ ng/ml از D-LPS منفی و با ng/ml ۰۴/ لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس مثبت شد . تیتر آنتی بادی گروه دریافت کننده LPS نسبت D-LPS بالاتر بود ، و اختلاف معنی داری از نظر حفاظت بخشی بین گروه های دریافت کننده LPS و D-LPS با گروه کنترل منفی وجود داشت ($p<0.05$) همچنین اختلاف معنی داری از نظر حفاظت بخشی بین گروه دریافت کننده LPS و D-LPS وجود نداشت ($p<0.05$).

نتیجه گیری نهایی : نتایج نشان داد که سمیت D-LPS بروسلا آبورتوس بشدت کاهش یافته می توان چندین برابر لیپوپلی ساکارید بروسلا آبرتوس از آن ، جهت تحریک سیستم ایمنی بکار برد و توانایی لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس نسبت به لیپوپلی ساکارید E.coli در ایجاد شوک سپتیک بسیار ضعیف تر است و می توان بطور مستقیم از آن بعنوان ایمنوژن استفاده کرد . همچنین حفاظت بخشیLPS و D-LPS احتمالاً ناشی از نقش مهم ایمنی همورال در عفونت ثانویه بروسلا می باشد .

واژه های کلیدی : لیپوپلی ساکارید ، بروسلا آبورتوس ، سم زدایی ، LAL ، آزمایش تب زایی در خرگوش

* **نویسنده مسئول:** گروه میکروب شناسی، دانشکده پیرا پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

E.mail:pakzad_i@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بروسلاها باکتری های گرم منفی کوچک ،داخل سلولی اختیاری ،شدیداً هوازی و سخت رشدی هستند که در گاو ، گوسفند ، بز و انسان ایجاد بروسلوزیس (بیماری مشترک بین انسان ودام) می کنند (۲،۱) .

لیپوپلی ساکارید (LPS) ، ترکیب عمده دیوارهٔ سلولی همه باکتریهای گرم منفی می باشد و از سه قسمت لیپید A ،قسمت مرکزی و زنجیره O تشکیل شده است (۳) . ترکیب لیپید A آن با خانواده انتروباکتریاسه متفاوت می باشد ، زنجیره O یک هموپلی مر خطی از ۹۶ تا ۱۰۰ زیر واحد است و بخش مرکزی لیپوپلی ساکارید کاملاً شناخته شده نیست (۴) . لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس برخلاف لیپوپلی ساکارید E.coli قادر به تحریک سلولهای B انسانی می باشد که ممکن است ناشی از تفاوت در ماهیت شیمیایی لیپید A آن باشد (۵ ، ۶) . تزریق کونژوگه زنجیره O- آلبومین سرم گاوی(OPS-BSA) به موش Balb/C موجب القاء تولید آنتی بادی و محافظت در برابر چالش با سویه بیماری زایی بروسلا آبورتوس می شود (۷) . آنتی بادیهای اختصاصی لیپوپلی ساکارید ، موش Balb/C در برابر چالش با سویه بیماری زایی بروسلا آبورتوس ۵۴۴ حفاظت بخش بوده است (۸) . بدلیل اینکه تزریق لیپوپلی ساکارید باکتریهای گرم منفی در بدن پستانداران ایجاد شوک سپتیک می کند ، جهت تحریک سیستم ایمنی آنرا باید سم زدایی نمود . سم زدایی از لیپوپلی ساکارید با روش های تیمار اسیدی و قلیایی واخیراً با آلکالین فسفاتاز صورت می گیرد (۵) .

لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس مهمترین ساختار محرک سیستم ایمنی هومورال می باشد که از آن بعنوان یکی از اجزاء یک واکسن زیر واحدی بر علیه بروسلوز نام می برند (۸) . هدف این تحقیق ، ارزیابی ایمنولوژیک و بررسی فعالیت بیولوژیکی لیپوپلی ساکارید و D-LPS بروسلا آبورتوس می باشد .

مواد و روشها

استخراج لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس

استخراج لیپوپلی ساکارید باکتری بروسلا آبورتوس S99 توسط ان_بوتانل اشباع شده با آب به روش Morrison و Levis که اخیراً توسط Phillips و همکارانش بهینه شده انجام گرفت (۱،۵) . لیپوپلی ساکارید استخراج شده با متانول سرد (۴ حجم) رسوب داده شده و دوبار با متانول سرد شستشو گردید . سپس در دور g ۱۰۰۰۰۰ با اولترا سانتیریفوژ رسوب داده شده و لیوفلیزه گردید (۱،۵،۹) .

آنالیز شیمیایی

مقدار پروتئین با روش برادفورد با استفاده از BSA بعنوان استاندارد تعیین گردید . مقدار اسیدهای نوکلئیک با روش اسپکتروفتومتری تخمین زده شد ، مقدار لیپوپلی ساکارید با ماده ۱و ۹ دی متیل متیلن بلو و با استفاده از لیپو پلی ساکارید استاندارد سالمونلا تیفی موریوم L-۶۵۱۱ در طول موج ۵۱۰ نانومتر تعیین گردید (۹) . لیپوپلی ساکارید تخلیص شده با سود ۱/ نرمال در دمای ۱۰۰ °C بمدت ۲ ساعت انکوبه شده سپس pH مخلوط با HCl یک نرمال به ۳/۵ رسانده و به دقت فاز رویی جدا سازی گردید (۳) . الکتروفورزیس لیپوپلی ساکارید در ژل ۱۴٪ SDS-PAGE حاوی اوره ۴ مولار انجام گرفت سپس با روش نیترات نقره رنگ آمیزی گردید (۱۰،۵) .

مطالعات بیولوژیک : لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس ، شکل سم زدایی شده آن (D-LPS) و لیپوپلی ساکارید E.coli برای فعالیتهای بیولوژیک آزمایش تب زایی در خرگوش و LAL ارزیابی شدند.

الف-آزمایش تب زایی در خرگوش:

آزمایش تب زایی با همکاری سازمان انتقال خون ایران با استفاده خرگوش نژاد نیوزیلندی (موسسه رازی : NZW) صورت گرفت . بعداز ۳۰ دقیقه ترکیبات فوق در رگ مارژینال گوش تزریق شد . هر یک ساعت به مدت ۳ ساعت دما ثبت گردید . وقتی دمای بدن یکی از خرگوش ها بیش از ۰/۶ درجه سانتیگراد افزایش یافت ، یا افزایش دمای مجموع سه خرگوش هر گروه به ۱/۴ درجه سانتیگراد رسید معرف مثبت بودن آزمایش تب زایی بود (۵ ،۱۱) .

ب- آزمایش LAL :

این آزمایش با کیت Gel Clot (HAEMACHEM U.S.A) طبق دستور موسسات USP و FAD برای ترکیبات فوق انجام شد (۸) .

www.SID.ir

Archive of SID

ایمیونیزاسیون: در این تحقیق چهار گروه ۱۲ تایی موش Balb/c ماده ۸-۶ هفته ای بطور داخل صفاقی با مواد زیر در حجم ۲۰۰ میکرولیتر تزریق شدند ، گروه اول (کنترل منفی) PBS ، گروه دوم ۳۰ میکروگرم LPS گروه سوم ۳۰ میکروگرم D-LPS گروه چهارم ، بروسلا آبورتوس سویه S19 5×10^4CFU (۸).

چالش : بعد از یک هفته از آخرین تزریق ۶ موش از هر گروه با 5×10^4CFU بروسلا آبورتوس سویه ۵۴۴ (انستیتو پاستور ایران دکتر نجاتی- دکتر تبرایی) مواجه شدند. چهار هفته بعد از چالش ، موشها با اتر بیهوش گردیدند ، و از طحال آنها بر روی محیط کشت بروسلا آگار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ، CO_2 ۵ درصد بمدت سه روز کشت گردید (۸) .

الایزا : این آزمون در میکروپلیت های ۹۶ خانه ای (Nunc) با استفاده از آنتی ژنهای LPS و D-LPS به میزان 10 µg/ml در PBS به روش Engvall و Perlmann انجام شد (۱۲) . از آنتی موس آنتی بادی کونژوگه به آنزیم پراکسیداز (Peroxidase –Conjugated rabbit anti-mouse Igs) و سوبسترای TMB (BioRad) استفاده و نتایج با دستگاه ELISA(Lab Systems Multi scan) Reader خوانده شد .

روش آماری: برای مقایسه میانگین نتایج گروها از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد .

نتایج

الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس شامل یک باند سبک و چند باند سنگین می باشد باند سبک نشانگر قسمت مرکزی و لیپید A لیپوپلی ساکاریدی بروسلا آبورتوس می باشد . باند سنگین که بصورت اسمیر دیده می شود نشان دهنده لیپوپلی ساکارید دست نخورده است (شکل- ۱، خانه ۱ و ۴) لیپوپلی ساکارید E.coli و سالمونلا تیفی موریوم است که حالت نردبانی دارند سبک ترین باند احتمالاً لیپید A می باشد (شکل-۱ ، خانه ۲ ، ۳) .

آزمایش تب زایی در خرگوش

این آزمایش با مقدار۱۰µg/mL لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس ، µg/ mL ۵/ لیپوپلی ساکارید E.coli مثبت و با مقادیر µg/mL ۵۰ ، ۱۰ D-LPS بروسلا آبورتوس منفی بود .

آزمایش LAL **:** این آزمایش با کیت Gel Clot طبق دستورات USP و FAD برای اندوتکسین باکتریها انجام شد . کمترین مقدار لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس که در آن آزمایش LAL مثبت بود ، ۰/۴۸۷ng/mL/ تعیین گردید . باتوجه به حساسیت تشخیصی کیت Gel Clot یک میلی گرم لیپوپلی ساکارید E.coli برابر EU ۱۲۰۰۰۰۰۰ و یک میلی گرم لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس برابرEU ۲۵۰۰۰۰۰ بدست آمد . و مقادیر ng/mL ۱۰ ، ۰/۲۵ ، از D-LPS بروسلا آبورتوس نتیجه آزمایش LAL آنها منفی بود . در حالی که مقادیر بسیار کمتر از لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس نتیجه آزمایش آنها مثبت بود . این نشان می دهد سمیت D-LPS تا حد زیادی کاهش یافته است .

شمارش باکتری پس از یک ماه چالش با سویه بیماریزای ۵۴۴ B.abortus

نتایج حاصل از شمارش باکتری از طحال این حیوانات به صورت میانگین لگاریتم در پایه ۱۰ در جدول (۱) ذکر شده است . آزمون آنالیز واریانس با فاصله اطمینان ۹۵٪ بین گروه اول (PBS) با LPS و D-LPS و گروه چهارم اختلاف معنی داری نشان می داد ($P<0.007$) اما بین گروه LPS و D-LPS اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P<0.995$) . با توجه به نتایج بالا می توان دریافت که در گروه اول تعداد باکتری افزایش یافته و هیچ گونه محافظتی دیده نمی شود در حالی که در گروه LPS و D-LPS تعداد باکتری کاهش یافته و محافظت نسبی مشاهده می شود .

نتایج الایزا : تیتر آنتی بادی در گروه های LPS و D-LPS به ترتیب 1/6400 و 1/3200 بود . همانطور که مشاهده می شود تیتر آنتی بادی گروه LPS بالاتر از D-LPS می باشد که احتمالاً ناشی از کاهش ایمنوژنیسته فرم سم زدایی شده این باکتری می باشد .

www.SID.ir

Archive of SID

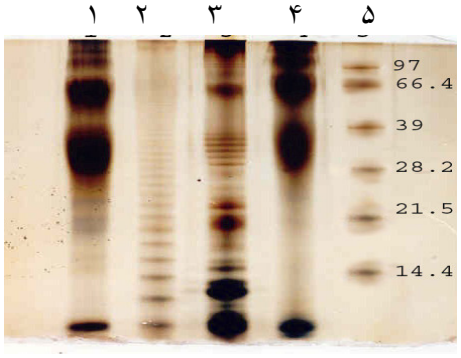
بحث

الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس و E.coli نشان داد که لیپوپلی ساکارید E.coli حالت نردبانی دارد ولی لیپوپلی ساکارید بروسلا از یک باند سبک وچند باند سنگین تشکیل شده که مطابق الگوی الکتروفورزی این لیپوپلی ساکارید ها در تحقیقات Golding و همکارانش می باشد (۵) .

در تحقیقات Golding و همکاران مشخص شد که سمیت لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس در آزمایشات کشندگی در موش و تب زایی درخرگوش از لیپوپلی ساکارید E.coli بسیار کمتر است و تعداد واحد اندوتوکسین یک میلی گرم لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس از یک میلی گرم لیپوپلی ساکارید E.coli کمتر می باشد (۵) . در آزمایش تب زایی در خرگوش مشاهده شد که لیپوپلی ساکارید E.coli نسبت به لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس بسیار قوی تر می باشد و آزمایش تب زای D-LPS با مقدار مساوی از لیپوپلی ساکارید بروسلا آبرتوس منفی بود . این نشان دهنده غیر سمی شدن لیپید A با داسیله شدن(Deacylation) می باشد . در آزمایش LAL نیمه کمی تعداد واحد اندوتوکسین یک میلی گرم لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس از یک میلی گرم لیپوپلی ساکارید E.coli کمتر و از یک میلی گرم D-LPS بیشتر بود . این نتایج احتمالا ناشی از تفاوت ماهیت لیپید A لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس با E.coli می باشد . این نشان دهنده این است که لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس در ایجاد شوک سپتیک بسیار ناتوان تر از لیپوپلی ساکارید E.coli است و شکل D-LPS تقریباً فاقد قدرت تب زایی و سمی می باشد . بنابراین می توان جهت تحریک سیستم ایمنی و یا بعنوان حامل در واکسنها از LPS و D-LPS بروسلا آبورتوس استفاده کرد . همچنین تیتر آنتی بادی گروه LPS بالاتر از D-LPS می باشد که این احتمالاً ناشی از کاهش نسبی ایمنوژنیسته D-LPS است . نتایج حفاظت بخشی LPS وD-LPS بصورت شمارش باکتری در گروه های مختلف نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین این دو گروه با گروه کنترل منفی وجود دارد که این نشانه نقش ایمنی هومورال در عفونتهای ثانویه بر علیه این باکتری می باشد .

نتیجه گیری

توانایی لیپوپلی ساکارید بروسلا نسبت به لیپوپلی ساکارید E.coli در آزمایشهای LAL و تب زایی در خرگوش بسیار کمتر می باشد و می توان از آن بعنوان ایمنوژن بطور مستقیم استفاده کرد . و همچنین LPS و D-LPS توانایی تحریک ایمنی هومورال را دارا می باشند که همراهی این زیر واحد باکتری با سایر زیر واحدها در تهیه واکسن زیر واحدی با توجه به نقش ایمنی هومورال در عفونت های ثانویه ضروری می باشد .



شکل-۱. SDS-PAGE لیپوپلی ساکاریدهای B.Abortus، E.coli و S.Typhi Murium . مقادیر ۱۰ (خانه۱) و ۲۰ میکروگرم (خانه ۴) از لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس ، ۱۰ میکروگرم از لیپوپلی ساکارید E.coli (خانه۲)و سالمونلا تیفی موریوم (خانه ۳) . اسمیر خانه ۱و۴ که کندتر حرکت کرده گروهی از باندها هستند که معرف لیپوپلی ساکارید دست نخورده (لیپد A ، بخش مرکزی و زنجیره O) می باشد . سریعترین باند در تمام خانه ها نشان دهنده لیپد A به تنهایی است . خانه ۵ مارکر می باشد .

www.SID.ir

Archive of SID

جدول -۱ . نتایج لگاریتم شمارش باکتری در گروهای مختلف

Group(n=5)	Log units of B.Abortus in spleen(mean±SD)
PBS	4.968±0.23
LPS	4.271±0.2
D-LPS	4.22±0.03
B.Abortus S19	2.146±0.18

References

1-Morrison C D and Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from E.coli 0111 : B4 prepared by two extraction procedures . *J Biol Chem* . 1975 ; 250 (8) : 2911-19 .

2-Grillo MJ ; Manerola L; Miguel ; MJ et al . Increases of efficacy as vaccine against Brucella abortus infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth bvrS/bvrR and rough wbkA mutants . *Vaccine* . 2006 ; 4(15) : 2910-6 .

3-Bhattacharjee KA ; Van de verg I ; Zadjoo J M et al. Protection of mice against Brucellosis by intranasal immunization with Brucella Melitensis lipopolysaccharide as a noncovalent complex with Neisseria Meningitides group B outer membrane protein . *Infect Immun* . 2002 ; 70 (7) : 3324-29 .

4-Ugalde E J ; Czibener C ; Feldman FM . Identification and characterization of the Brucella abortus phosphoglucomutase gene . Role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication . *Infect Immun* . 2000 ; 68 (10) : 5716-23 .

5-Golding B ; Hoffman T ; Frasch C et al. Lipopolysaccharide (LPS) from Brucella abortus is less toxic than that from E.coli , suggesting the possible use of B.abortus as a carrier in vaccines . *Infect Immun* . 1992 ; 60 (4) : 1385-89 .

6-Spera J M ; Ugalde JE ; Mucci J et al. AB lymphocyte mitogen is a Brucella abortus virulence factor required for persistent infection *PNAS* . 2006; 103(44) : 16514-19 .

7-Jacques J ; Bernaardin OV and Dubray G. Induction of antibody and protective responses in mice by Brucella O-polysaccharide-BSA conjugate . *Vaacine* . 1991 ; 9 : 896-900 .

8-Jacquues I ; Cloeckaert A and Limet J N . Protection conferred on mice by combination of monoclonal antibodies directed against outer-membrane proteins or smoth lipopolysaccharide of Brucella . *J Med Microbiol* . 1992 ; 37 (2) : 100-3 .

9-Apicella AM ; Griffiss M and Schneider H. Isolation and characterization of lipopolysaccharides , lipooligosaccharides , and lipid A. *Methods Enzymol* . 1994 ; 235 : 242-252 .

10-Tsai MC and Frasch ECA. Sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide agels . *Anal Biochem* . 1982 ; 119 : 115-119 .

11-Nakagawa Y ; Maeda H and Murai T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes . Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test . *Clin Diagn Lab Immunol* . 2002 ; 9 (3) : 588-97 .

12-Engvall E and Perlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay . ELISA III . Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes . *J . Immunol* . 1972 ; 109 :129-35 .

www.SID.ir