

Evaluation of Immunogenicity of *Yersinia enterocolitica* O:8 Oligopolysaccharide-DiphtheriaeToxoide Conjugate in Mice

Rezavian SM, Shapouri R*

Department of Microbiology, Faculty of Basic and medical Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

* Corresponding Author. Tel:+989123255364 Fax: +982433420030 E-mail: rezashapoury@yahoo.com

Received: Dec 15, 2014 Accepted: May 26, 2015

ABSTRACT

Background & objectives: Yersiniosis is created by *Yersinia enterocolitica* O:8 and causes problems in the world especially in cold and mild countries. The purpose of this study is to evaluate the immunogenicity of *Yersinia enterocolitica* O:8 oligopolysaccharide (OPS) conjugate to diphtheria toxoid (DT) as a vaccine candidate.

Methods: After cultivation of bacteria, the LPS were isolated by modified hot phenol method. Then dialysis and concentration were done and the OPS were extracted by acetic acid 2%. To conjugate with diphtheria toxoid, ADH was used as a spacer molecule and EDAC as a linker. Conjugate was purified by gel filtration. Then 4 groups of female BALB/c mice were selected (15 mice in each group). Injection was performed intraperitoneally in three doses with two weeks interval. Then serum samples were collected and antibody response against OPS was measured by indirect ELISA method for detection of total IgG, IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3.

Results: After second and third doses, OPS-DT received group showed significant increase in all types of antibodies titer in anti-OPS in comparison to group that received nonconjugated OPS. The increase in titer of antibodies was as: OPS-DT>OPS>DT. A remarkable increase was shown in total IgG and IgM titers (with total amount of 3204 and 670, respectively). In IgG1 subclass the amount was 920 and in other subclasses of IgG (IgG3, IgG2a and IgG2b) the amounts were 910, 110, and 99, respectively.

Conclusion: The results shows that OPS of *Yersinia enterocolitica* O:8 increases the anti-OPS antibodies in the form of conjugate with diphtheria toxoid and could be considered as an appropriate vaccine candidate.

Keywords: *Yersinia enterocolitica* O:8, OPS, Conjugate Vaccine, Diphtheria Toxoid.

بررسی ایمنی زایی کونژوگه OPS، یرسینیا/انتروکولیتیکا:۸:۰ با توکسوئید دیفتری

به عنوان نامزد واکسن در موش

سید مصطفی رضویان، رضا شاپوری*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۰ ۳۳۴۲۰ ۹۱۲۳۲۵۵۳۶۴. فاکس: ۰۳۰ ۳۳۴۲۰ ۰۴۰. پست الکترونیک: rezashapoury@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: بیماری پرسینیوز توسط باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا:۸:۰ به وجود می‌آید. این بیماری باعث بروز مشکلاتی در بیشتر کشورهای جهان از جمله کشورهای سرد و معتدل می‌گردد. هدف از این مطالعه، بررسی ایمنی زایی کونژوگه OPS، یرسینیا انتروکولیتیکا:۸:۰ با توکسوئید دیفتری (DT)، به عنوان نامزد تهیه واکسن (OPS-DT) بود.

روش کار: بعد از کشت انبوی باکتری، LPS با فنل داغ اصلاح شده، جدا گردید. OPS نیز بعد از دیالیز و تغليظ با اسید استیک ۰٪ جدا گردید. برای کونژوگه کردن با توکسوئید دیفتری، ADH به عنوان مولکول فاصله‌گذار و EDAC به عنوان اتصال‌دهنده استفاده شد. هم‌چنین تخلیص کونژوگه با عبور از ژل فیلتراسیون صورت گرفت. سپس چهار گروه ۱۵ تایی از موش‌های BALB/c ماده انتخاب شد. تزریق به صورت سه دوز تزریق داخل صفاقی IP در فواصل دو هفته‌ای انجام گرفت. سپس نمونه سرم گردآوری شد. پاسخ آتنی بادی علیه یرسینیا انتروکولیتیکا:۸:۰ به وسیله روش الیزای غیرمستقیم برای تعیین میزان آتنی بادی‌ها انجام گردید.

یافته‌ها: بعد از دومین و سومین دوز تزریق، گروه‌های واکسینه شده با OPS-DT افزایش چشم‌گیری در میزان تیتر تمام آتنی بادی‌ها علیه OPS در مقایسه با OPS غیرکونژوگه نشان دادند. این افزایش تیتر در تمام آتنی بادی‌ها، به این ترتیب بود: OPS-DT>OPS>DT. افزایش قابل ملاحظه‌ای در تیتر IgG و IgM مشاهده شد که مقدار آن‌ها به ترتیب با ۶۷۰ و ۴۳۰ متر بود. در زیر کلاس IgG1 به مقدار ۹۲۰ و در IgG2a و IgG2b به ترتیب ۱۱۰.۹۹ و ۹۱۰.۹۰ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که OPS، یرسینیا انتروکولیتیکا:۸:۰ آتنی بادی ضد (OPS) را در فرم کونژوگه با توکسوئید دیفتری افزایش داده و می‌تواند نامزد تهیه واکسن مناسب به شمار آید.

واژه‌های کلیدی: یرسینیا انتروکولیتیکا:۸:۰، OPS، واکسن کونژوگه، توکسوئید دیفتری

دریافت: ۹۴/۹/۲۴ پذیرش: ۹۴/۳/۵

نیز در pH=۷-۸ صورت می‌گیرد [۲]. جداسازی این ارگانیسم با استفاده از روش‌های غنی‌سازی، بکارگیری روش سرما و با استفاده از KOH به شدت تقویت می‌شود [۳]. ارتباط بیماری‌های انسان با خوردن مواد غذایی آلوده، آب کلر نزدی و محصولات حیوانی توسط تحقیقات فراوان به طور کامل اثبات شده است [۴]. مواد غذایی یخچالی وسیله انتقالی مناسبی می‌باشد، چرا که این باکتری نه تنها در دمای یخچال زنده می‌ماند، بلکه رشد نیز می‌کند. انتروکولیت حاصل از یرسینیا انتروکولیتیکا:۸:۰ با علائمی مانند:

مقدمه

باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا:۸:۰ بیماری‌زای دستگاه معده‌ای و روده‌ای است که باعث اسهال یا انتروکولیت حاد در تمام دنیا می‌شود. این باسیل بی‌هوای اختیاری، اوره‌آز مثبت، گرم منفی، لاکتوز منفی به صورت متعدد از خاک، آب، حیوانات مختلف و بسیاری از مواد غذایی مثل گوشت، شیر، سبزیجات و لبیتیات جدا شده است [۱]. دمای بینه رشد آن ۲۹ درجه سلسیوس می‌باشد، تعدادی از ویژگی‌های فنوتیپی باکتری وابسته به دما می‌باشد. رشد بینه

واکسن‌ها بسیاری از بیماری‌های پنوموکوکی و مننژیت به طور مطلوب کنترل گردیده است [۱۱]. هدف از این تحقیق طراحی واکسنی کارآمد علیه یرسینیا انتروکولیتیکا ۰:۸ بود که پتانسیل بالایی برای ایجاد سلول‌های خاطرها داشته باشد.

روش کار

باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا ۰:۸

باکتری مذکور از مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تهیه شد. توکسوئید دیفتری، ۶۰ عدد موش ۴ تا ۵ هفت‌های ماده از نژاد R&D/BALB/c از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه گردید. محیط کشت مولر هینتون آگار و نوترینت براث از شرکت Merck (آلمان)، آنتی‌بادی مورد استفاده در الیزا از شرکت R&D (آمریکا)، اتیل-۳-۳-۳ دی متیل آمینو-پروپیل) کربودیمید^۲، آدپیک اسید دی هیدرازید^۳ و سایر مواد مورد نیاز از شرکت SIGMA (آمریکا) تهیه گردید.

استخراج OPS

ابتدا کلنی‌های باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا ۰:۸ از محیط کشت مولر هینتون آگار به محیط کشت نوترینت براث تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت، گرم خانه گذاری شد. به هر یک از ارلن‌ها ۵/۰ سی سی فنل اضافه شده و در بنماری ۶ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از آن سانتریفیوژ صورت گرفت. به رسوب سلولی حاصل از مرحله قبل ۲۵ سی سی آب مقطر اضافه گردید، به مدت ۲۰ دقیقه در بنماری ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۲۶ سی سی فنل اضافه شد، به مدت ۳۰ دقیقه در بنماری ۶۶ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه سریع روی بخار سرد گردید، بعد از سانتریفیوژ مرحله فنلی جداسازی و دیالیز شد، بعد از اضافه شدن ۹/۵

اسهال و درد شکم مشخص می‌شود. اسهال به مدت ۷-۱۴ روز ادامه دارد و به طور متوسط در ۶ هفته بهبود می‌یابد. دردهای شکمی شدید در ناحیه یک چهارم تحتانی راست ایجاد می‌شود که شباهت بسیاری به آپاندیسیت دارد. اسهال ناشی از این باکتری در موارد زیادی در ماههای سرد و نیز در افراد مذکور و جوان شایع است. در بعضی از کشورها مثل هلند، بلژیک، کانادا و استرالیا تعداد آلودگی‌های حاصل از یرسینیا انتروکولیتیکا ۰:۸ بیشتر از عفونت‌های شیگلاکی است [۶،۵]. این باکتری قادر به ایجاد لنفادنیت، سلولیت و عفونت‌های زخم، فارنژیت، سپتیسمی و مننژیت، آندوکاردیت، پنومونی، آبسه‌های متمنکز در کبد و طحال و استئومیلیت می‌باشد. واکنش‌های ثانویه مثل اریتمانوزووم، گلومرولونفریت و آرتربیت نیز احتمالاً توسط این باکتری ایجاد می‌شود [۷،۸]. با توجه به اینکه کیت‌ها و تست‌های آزمایشگاهی مغاید و کارآمدی برای تشخیص سریع این باکتری وجود ندارد، درمان‌های سریع و کارآمد صورت نمی‌گیرد. همین طور به دلیل مقاومت روز افزون به درمان آنتی‌بیوتیکی تا به حال واکسن کارآمدی بر علیه آن تولید نشده است [۹،۱۰]. زنجیره جانبی O^۱ یا الیکوپلی ساکارید LPS (OPS) خارجی‌ترین و آنتی‌ژنیک‌ترین بخش است، که ۸۰-۹۰ درصد از آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد OPS، علیه OPS می‌باشند، ولی از آنجا که واکسن‌های پلی ساکارید در فعال کردن سلول‌های Th ناتوان است و فقط سلول‌های B را به صورت مستقل از T فعال می‌کنند، یک راه جهت تحریک مستقیم سلول‌های Th در پاسخ به آنتی‌ژن‌های پلی ساکاریدی، کونژوگه کردن آنتی‌ژن با انواعی از حامل‌های پروتئینی است [۱۱]. امروزه برای کنترل بسیاری از بیماری‌ها، از واکسن‌های گلیکوپروتئینی کونژوگه استفاده می‌گردد، و با استفاده از این

² EDAC

³ ADH

^۱ O-Side Chain

تزریق کونژوگه OPS-DT، گروه چهارم به عنوان شاهد برای تزریق سرم فیزیولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. واکسیناسیون سه بار با فواصل هر دو هفته یک بار به صورت داخل صفاقی انجام شد (۵/۰ میلی لیتر به ازای هر موش). خون گیری از قلب موش با فواصل دو هفته‌ای پس از هر بار تزریق (هر بار از ۳ موش) انجام گرفت. سپس سرم خون‌ها به وسیله سانتریفیوژ جداسازی گردید. تست الایزا برای تعیین میزان آنتی‌بادی‌های سرمی IgG2b، IgG2a، IgG1، IgM، IgA، IgG3 و IgG تام انجام گرفت [۲۲-۱۹].

انجام الایزا غیرمستقیم

ابتدا OPS در بافر کربنات ۵/۰ مولار با pH=۶/۹ با غلظت نهایی ۲ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه گردید و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس پلیت با بافر شستشو سه بار شستشو داده شد (هر بار ۵۰ میکرولیتر). محلول بلوه کننده به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها افزوده و برای ۶۰ دقیقه پلیت در دمای اتاق انکوبه شد. پلیت‌ها شستشو شد، رقت سازی به نسبت ۱:۱۵ انجام شد، پس از انجام رقت سازی از همه چاهک‌ها ۶ میکرولیتر برداشته شد تا حجم سرم رقیق شده در چاهک‌ها به ۱۰۰ میکرولیتر برسد. سپس برای ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شده و پلیت‌ها شستشو داده شد. آنتی‌بادی‌ها کونژوگه با آنزیم هورس رادیش پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰ در بافر PBS به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه گردید و پلیت برای ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس پلیت‌ها شستشو داده شد. محلول سوبسترا به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شده و پلیت برای ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه شد. میزان جذب نوری پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (لازم به ذکر است برای سنجش سایر آنتی‌بادی‌های القایی نیز تمام

سی‌سی اثانول به مدت ۲ ساعت در فریزر قرار داده شد، بعد از سانتریفیوژ برای استخراج نهایی ۳ LPS برابر حجم الكل و ۱ سی سی NaCl اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در فریزر قرار داده شد. بعد از یک ساعت سانتریفیوژ محلول شفاف رویی دوربریخته شد و رسوب زیرین که LPS بود جدا گردید. برای استخراج OPS رسوب در اسید استیک٪ ۲ حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سلسیوس اتوکلاو شد، سپس دیالیز گردید [۱۳.۱۲].

تهیه کونژوگه OPS پرسینیا/اندروکولیتیکا O:۸ با توکسوئید دیفتری (DT)

به OPS حاصل از مرحله قبل سیانوژن بروماید در استونیتریل ۱۵۰ میکرولیتر اضافه شد، بعد از آن یک گرم ADH و ۵/۰ مولار سدیم بی‌کربنات اضافه شده و به مدت ۱۸ ساعت در یخچال نگهداری شد، سپس ۱/۵ سی‌سی توکسوئید دیفتری و بعد یک گرم EDAC اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در یخچال نگهداری گردید [۱۵.۱۴].

جمع آوری بخش حاوی مولکول کونژوگه

ابتدا ستون حاوی ژل سفارز CL-4B با محلول کلرید سدیم ۲/۰ مولار شستشو و محلول اصلی کونژوگه از ستون عبور داده شد. سپس بخش‌های جمع آوری شده در دو طول موج ۲۱۰ نانومتر (برای تشخیص پلی ساکاریدها) و ۲۸۰ نانومتر (برای تشخیص پروتئین‌ها) قرائت شدند و لوله‌هایی که بیشترین جذب را در هر دو طول موج داشتند، به عنوان بخش‌های حاوی مولکول کونژوگه جمع آوری و با هم ادغام شدند. سپس کونژوگه‌های تهیه شده با کمک سانتریفیوژ، تغليظ و از فیلتر ۴۵٪ میکرونی عبور داده شدند [۱۶].

واکسیناسیون و سنجش آنتی‌بادی‌های سرمی در موش

۶۰ عدد موش c/BALA به چهار گروه تقسیم شد. گروه اول برای تزریق OPS غیرکونژوگه، گروه دوم برای تزریق توکسوئید دیفتری، گروه سوم برای

تست الایزا انجام شد. در بررسی تیترهای به دست آمده دو هفته بعداز اولین دوز تزریق افزایش چشم‌گیری در تیتر آنتی‌بادی‌ها علیه OPS مشاهده نشد، اما پس از تزریق دوم و سوم ترتیب آنتی‌بادی‌های تولیدشده در گروه‌های مختلف به این ترتیب بود: OPS-DT > OPS > DT. با توجه به نتایج به دست آمده از طریق آزمون LSD با $p < 0.01$ تمامی گروه‌های واکسینه با محلول کونژوگه OPS و OPS-DT نسبت به گروه‌های کنترل در دو هفته پس از تزریق اول، دوم و سوم از نظر میزان تیتر آنتی‌بادی سرمی اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. همچنین ۲ هفته بعداز سومین تزریق افزایش چشم‌گیری در تیتر آنتی‌بادی علیه OPS در OPS-DT مشاهده شد، که این افزایش در تیتر IgM و IgG نام ملحوظه بود و مقدار آن‌ها به ترتیب برابر با ۶۷۰، ۴۳۰ و در زیر کلاس IgG1 به مقدار ۶۷۰، ۴۳۰ و در IgG2a، IgG2b، IgG3 به ترتیب مقدار ۱۱۰، ۹۹ و ۹۱ مشاهده شد (جدول ۱).

مراحل فوق تکرار و آنتی‌بادی خود مواجه شدند) [۲۳، ۲۴].

آزمون آماری

به منظور بررسی اختلاف تیترهای سرمی گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل، از نرم افزار SPSS و آزمون آماری یک طرفه ANOVA و Tukey استفاده شد [۲۶] ($p < 0.01$).

یافته‌ها

(الف) برای تخلیص مولکول‌های کونژوگه OPS-DT از مولکول‌های غیرکونژوگه آن را از ستون ژل فیلتراسیون حاوی سفاروز CL-4B عبور داده و ۲۸۰ نوری فرکشن‌ها در طول موج ۲۱۰ و نانومتر به ترتیب برای OPS و توکسوئید دیفتري قرائت شد، که در نهایت فرکشن‌های ۸۰ و ۸۱ حاوی گونژوگه OPS-DT بودند که جدا شدند.

(ب) تیتر آنتی‌بادی‌های سرمی در مدل حیوانی: موش‌های BABL/c هر ۱۴ روز طی سه مرحله واکسینه شدند. خون‌گیری و بررسی عیار آنتی‌بادی‌های مختلف هر دو هفته یک بار به وسیله

جدول ۱. میزان تیتر سرمی آنتی‌بادی‌ها برای دو هفته پس از تزریق‌های اول، دوم و سوم

| آنتی‌بادی | دو هفته بعد از تزریق اول | | | | دو هفته بعد از تزریق دوم | | | | دو هفته بعد از تزریق سوم | | | |
|-----------------------|--------------------------|-----|----|-----|--------------------------|------|----|-----|--------------------------|------|----|------------------|
| | OPS-DT ¹ | OPS | DT | N.S | OPS-DT | OPS | DT | N.S | OPS-DT | OPS | DT | N.S ¹ |
| IgG ₁ اتام | ۳۱.** | ۹۵* | . | . | ۱۰۵.** | ۳۲۵* | . | . | ۳۰۴** | ۳۶.* | . | . |
| IgG1 | ۹.** | ۶۷* | . | . | ۳۵.** | ۱۱۱* | . | . | ۹۰.** | ۱۴۵* | . | . |
| IgG2a | ۳۵** | ۲۰* | . | . | ۷۰.** | ۵۰* | . | . | ۱۱۰** | ۶۸* | . | . |
| IgG2b | ۲۵** | ۱۸* | . | . | ۷۵** | ۲۵* | . | . | ۹۹** | ۳۹* | . | . |
| IgG3 | ۹۹** | ۶۰* | . | . | ۴۰۰** | ۱۰۰* | . | . | ۹۱.** | ۱۳۸* | . | . |
| IgM | ۱۰۰** | ۹۰* | . | . | ۲۴۰** | ۱۸۰* | . | . | ۶۷۰** | ۲۱۰* | . | . |
| IgA | ۱۷** | ۱۱* | . | . | ۲.** | ۱۵* | . | . | ۲۶** | ۱۹* | . | . |

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل با $p < 0.01$

** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین OPS-DT و OPS با $p < 0.01$

1=الیکوپلی ساکارید، DT=توکسوئید دیفتري، N.S=Normal Saline

بیماری‌های روده‌ای را در انسان به وجود می‌آورد که توسط آب و غذای خوب پخته نشده و محصولات حیوانی منتقل می‌شود [۱]. این بیماری غالباً در

بحث
بررسینیا انتروکولیتیکا 8: بیماریزای مشترک دستگاه گوارش انسان و حیوان است که طیف گسترده‌ای از

IgG2b افزایش نشان داد. در زیرکلاس‌های IgG3، IgG1، IgG2a، IgG1 نیز تیتر آنتی‌بادی‌ها در تزریق سوم نسبت به تزریق اول افزایش نشان دادند، که در زیرکلاس‌های IgG3 و IgG1 افزایش چشم‌گیری مشاهده گردید (جدول ۱). IgM ایمونوگلوبولین اصلی در پاسخ اولیه است و از موثرترین ایمونوگلوبولین‌ها، در آگلوتیناسیون و تثبیت سیستم کمپلمان محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر تیتر IgM علیه OPS در گروه‌های واکسینه با OPS-DT در تزریق سوم نسبت به تزریق اول از ۱۰۰ به ۶۷۰ افزایش نشان داد (جدول ۱). IgA عمده‌ترین آنتی‌بادی است که در بافت مخاطی لنفاوی تولید می‌گردد و از سلول‌های پوششی مخاطی به داخل مجاري ترشح می‌شود. در این پژوهش IgA تولیدی علیه OPS دو هفته پس از تزریق سوم در گروه‌های واکسینه با OPS-DT به طور غالب مشاهده شد. در دهه‌های اخیر تحقیقات گستردگی برای بررسی تیتر آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه واکسن‌های کونژوگه انجام شده است. در سال ۱۹۸۶، کریز و همکاران پلی‌ساکارید مشتق شده از LPS سودوموناس آئروژنیوز/ با توکسوئید کزان کونژوگه نموده و از ADH به عنوان مولکول فاصله‌گذار و EDAC به عنوان عامل جفت کننده استفاده کردند، میزان تیتر آنتی‌بادی IgG تولید شده علیه ۱۹ LPS برابر بود، در ۸۲ درصد از داوطلبان افزایش در میزان تیتر آنتی‌بادی‌ها بیش از ۴ برابر نشان داده شد و میزان تیتر آنتی‌بادی علیه توکسوئید کزان در ۵۶ درصد موارد بیش از ۴ برابر افزایش داشت [۲۴]. همچنین میدوینتر^۱ و همکاران در مطالعه خود دریافتند که این‌زایی اندک پلی‌ساکارید را می‌توان توسط کونژوگه کردن با توکسوئید دیفتری برطرف کرد. برای این منظور بخش پلی‌ساکارید از لیپوپلی‌ساکارید باکتری پیتوسپیرا/اینتروگانس را با توکسوئید دیفتری کونژوگه کردند، در موش‌ها شاهد افزایش حداقل

کودکان و بزرگسالان شایع است. دومین یا سومین علت شایع اسهال نیز می‌باشد [۲]. ماهیت طبیعی و اکتسابی این ارگانیسم در مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها موجب شده که محققین به دنبال روش‌های نوینی برای درمان و پیش‌گیری از عفونت ناشی از این باکتری باشند [۹]. هدف از مطالعه حاضر این بود که با کونژوگه کردن توکسوئید دیفتری به عنوان یک بخش پروتئینی با OPS به روش آمیداسیون، تولید واکسنی شود که پتانسیل بالایی برای حفاظت طولانی و پایدار در هر دو گروه بزرگسال و خردسال داشته باشد. دلیل انتخاب توکسوئید دیفتری و کونژوگه آن با OPS، پرسنیا/انتروکولیتیکا O:۸ تهیه یک ترکیب ایمونوژن با کارایی مناسب علیه بیماری پرسنیوز بود و استفاده از خواص توکسوئید دیفتری به عنوان حامل برای OPS اولیگوپلی‌ساکارید، استفاده از خواص اجوانی پرسنیا/انتروکولیتیکا O:۸ برای القای اینمی بیشتر به توکسوئید دیفتری بود، تا در صورت اثبات کارایی بتوان این کونژوگه را به عنوان نامزد واکسن برای بیماری پرسنیوزیس معرفی کرد.

در چند دهه اخیر واکسن‌های کونژوگه متعددی به منظور القای حفاظت علیه ارگانیسم‌های بیماریزا طراحی شده است. در سال ۲۰۱۱، نجفیان و همکاران مطالعه‌ای بر روی این‌زایی کونژوگه تهیه شده آلزینات سودوموناس آئروژنیوز/ با توکسوئید کزان به روش آمیداسیون در موش انجام دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که آنتی‌بادی‌های IgG، IgM، توکلید شده علیه آلزینات و LPS در حالت کونژوگه نسبت به حالت غیرکونژوگه در هر سه تزریق به طور متوسط دو تا سه برابر افزایش می‌یابد [۲۵]. در مطالعه حاضر نیز تیتر آنتی‌بادی‌های توکلیدی علیه OPS به صورت کونژوگه بیش از OPS به صورت توکلوئید کونژوگه بود که میزان تیتر IgG توکلید شده علیه OPS در گروه‌های واکسینه با OPS-DT در تزریق سوم نسبت به تزریق اول از ۳۱۰ به ۳۲۰ می‌باشد.

^۱ Midwinter

یاوری و همکاران PRP هموفیلوس آنفلوئز/ تیپ b را با پروتئین KLH کونژوگه کردند و شاهد افزایش اینمنی زایی و فاگوسیتوزی بودند [۲۹].

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از الیزا که نشان از تولید بالای آنتی‌بادی‌های IgG و دیگر آنتی‌بادی‌ها دارد، می‌توان نتیجه گرفت که توکسوئید دیفتری به عنوان یک حامل پروتئینی با OPS، یرسینیا انتروکولیتیکا O:۰ به روش آمیداسیون تولید واکسنی می‌کند که در برابر بیماری یرسینیوزیس حاصل از یرسینیا انتروکولیتیکا O:۸ موثر است. در این تحقیق هم‌چنین مشخص گردید که توکسوئید دیفتری قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان پروتئین حامل در واکسن‌های کونژوگه را دارا می‌باشد.

تشکر و قدردانی

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

۱۰ برابری آنتی‌بادی‌ها در گروه‌های واکسینه با کونژوگه OPS-DT نسبت به گروه‌های واکسینه با LPS بودند [۲۷]. در مطالعه دیگری پاسول^۱ و همکاران پلی ساکارید-O شیکلا سوئئی و شیکلا فلکسیری را با توکسین غیرفعال شده دیفتری (CRM ۱۹۷) کونژوگه کردند. در کونژوگه میزان IgG ضد لیپوپلی ساکاریدی یک هفته پس از تزریق افزایش یافت [۲۳]. عسکری و همکاران در مطالعه خود اقدام به تهیه کونژوگه کپسول پلی‌ساکاریدی استریتوکوکوس آگلاکتیه تیپ III با توکسوئید دیفتری با روش آمیداسیون نمودند. نتایج نشان داد که کونژوگه حاصل فعال بوده لذا می‌توان از آن برای تزریق حیوانی و مطالعه آنتی‌بادی‌های القایی استفاده نمود [۲۸]. در تحقیق حاضر تیتر آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه OPS در گروه‌های واکسینه با کونژوگه OPS-DT بیش از OPS غیرکونژوگه بود، به طوری که میزان تیتر آنتی‌بادی IgG به طور متوسط ۸ برابر افزایش نشان داد، که نشان‌دهنده وزن مولکولی مناسب کونژوگه تهیه شده می‌باشد. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در پژوهش‌های ذکر شده نیز همخوانی دارد. در مطالعه دیگری

^۱ Passwell

References

- 1- Scallan, E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan; 17(1):7–15.
- 2- Ostroff S. Yersinia as an emerging infection: epidemiologic aspects of yersiniosis. *Contrib Microbiol Immunol*. 1995 Oct; 13(7): 5-10.
- 3- Guinet F, Carniel E, Leclercq A. Transfusion-Transmitted Yersinia enterocolitica sepsis. *Clin Infect Dis*. 2011 Sep; 53(6):583-91.
- 4- Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MT, Crossman L, Challis GL, et al. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity Yersinia enterocolitica strain 8081. *PLoS Genet*. 2006 Dec; 15(12): e206.
- 5- Zadernowska A, Wierzchowska WC, Trockenheim LL. Yersinia enterocolitica: a dangerous, but often ignored, foodborne pathogen. *Food Rev Int*. 2014 Dec; 30: 53–70.
- 6- Bose R, Thinwa J, Chaparro P, Zhong Y, Bose S, Zhong G, et al. Mitogen-activated protein-independent interleukin-1 intracellular signaling is modulated by YOPP. *Infect Immun*. 2012 Jan; 80(1):289-97.
- 7- Murros-Kontiainen A, Johansson P, Niskanen T, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Bjorkroth J. Yersinia pekanenii sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011 Oct; 61(10): 2363-7.

- 8- Chen PE, Cook C, Stewart AC, Nagarajan N, Sommer D, Pop M, et al. Genomic characterization of the *Yersinia* genus. *Gen Biol.* 2010 Jan; 11(7): 114-23.
- 9- Noll A, Autenrieth B. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* HSP60 immunostimulating complexes or *Yersinia* HSP60 plus interleukin-12. *Infect Immun.* 1996 Aug; 64(8): 2955-2961.
- 10- María S, Genaro D, Waidmann M, Kramer U, Hitziger N, Bohn E, et al. Attenuated *Yersinia enterocolitica* mutant strains exhibit differential virulence in cytokine-deficient mice: implications for the development of novel live carrier vaccines. *Infect Immun.* 2003 Apr; 71(4): 1804-12.
- 11- Bottone EJ. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* 1999 Apr; 1(4):323-33.
- 12- Shapouri R. Evaluation of immune responses of *Brucella abortus* detoxified lipopolysaccharide and polysaccharide-O conjugates to tetanus toxoid. Ph.D. thesis Tarbiat Modares University; 2005. (Full text in Persian)
- 13- Pier GB, Koles NL, Meluleni G, Hatano K, Pollack M. Specificity and function of murine monoclonal antibodies and immunization-induced human polyclonal antibodies to lipopolysaccharide subtypes of *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O6. *Infect Immun.* 1994 Apr; 62(4): 1137-43.
- 14- Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr; 16(2): 220-9.
- 15- Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najar-Peerayen S, Mousavi-Hosseini K, Moazeni M, Diavid GE. Synthesis & characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate conjugate. *J Med Microbiol.* 2006 Oct; 55(10): 1441-6.
- 16- Cryz SJ Jr, Sadoff JC, Furer E, Germanier R. *Pseudomonas aeruginosa* polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine: safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis.* 1986 Oct; 154(4): 682-8.
- 17- Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najar-Peerayen S, Mousavi-Hosseini K, Moazeni M, Rezvan H, et al. Preliminary investigation on the isolation of alginate produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Mic.* 2005 Dec; 55(4): 279-82.
- 18- Brett PJ, Woods DE. Structural and immunological characterization of *Burkholderia pseudomallei* O-polysaccharide-flagellin protein conjugates. *Infect Immun.* 1996 Jul; 64(7): 2824-8.
- 19- Briand MY, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 2002 May; 84(5-6): 499-510.
- 20- Zaidi TS, Priebe GP, Pier GB. A live-attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine elicits outer membrane protein-specific active and passive protection against corneal infection. *Infect Immun.* 2006 Feb; 74(2): 975-83.
- 21- Kasper DL, Paoletti LC, Wessels MR, Guttormsen HK, Carey VJ, Jennings HJ, et al. Immune response to type III group B streptococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J Clin Invest.* 1996 Nov; 98(10): 2308-14.
- 22- Cryz SJ Jr, Sadoff JC, Furer E. Octavalent *Pseudomonas aeruginosa* O- polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. *Vaccine.* 1989 Jan; 18(6): 75-80.
- 23- Passwell JH, Harlev E, Ashkenazi S, Chu C, Miron D, Ramon R, et al. Safety and immunogenicity of improved *Shigella* O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines in adults. *Infect Immun.* 2001 Mar; 69(3): 1351-7.
- 24- Cryz SJ Jr, Fürer E, Germanier R. Protection against fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis by immunization with lipopolysaccharide and high- molecular-weight polysaccharide. *Infect Immun.* 1984 Mar; 43(3): 795-9.
- 25- Najafian M. Immunological evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate conjugated to tetanus toxoid in mice as a vaccine candidate. M.Sc. thesis, Zanjan Branch. Islamic Azad University; 2011. (Full text in Persian)
- 26- Jaber Gh, Shapouri R, Kariminik A. Immunization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-conjugated to diphtheria toxoid in mice. *J Microbial World.* 2013 Jun; 6(15):138-47. (Full text in Persian)

- 27- Midwinter A, Faine S, Adler B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. J Med Microbiol. 1990 May; 33(3): 199-204.
- 28- Asgari R, Rahnema M, Shapouri R. Streptococcus agalactiae type III capsular poly saccharide preparation conjugated with diphtheria toxoid as candidate vaccines, The 6th International & 11th National Congress on Quality Improvement in Clinical Laboratory, 2013 Apr 20-23, Tehran, Iran. (Full text in Persian)
- 29- Yavari H, Syadat D, Shapouri R, Shafiei M. Preparation and evalution immunogenic PRP *Haemophilus influenzae* type b-KLH, PLGA conjugate in mice. AMUJ. 2013 Apr; 16(71):104-12. (Full text in Persian)