Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.15, No.2, Summer 2015, Pages 189 - 197

Evaluation of Immunogenicity of *Yersinia enterocolitica* O:8 Oligopolysaccaride-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 especialy in cold and mild countries. The purpose of this study is to evaluate the immunogenicity of *Yersinia enterocolitica O:8* oligopolysaccaride (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 recieved group showed significant increase in all types of antibodies titer in anti-OPS in comparison to group that recived 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.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

بررسی ایمنی زایی کونژوگه OPS، *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 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: ۰۹۱۲۳۲۵۵۳۶٤ فاکس: ۳۳٤۲۰۰۳۰ ۰۲٤ پست الکترونیک: rezashapoury@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: بیماری یرسینیوز توسط باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 به وجود می‌آید. این بیماری باعث بروز مشکلاتی در بیش‌تر کشورهای جهان از جمله کشورهای سرد و معتدل می‌گردد. هدف از این مطالعه، بررسی ایمنی‌زایی کونژوگه OPS، *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 با توکسوئید دیفتری (DT)، به عنوان نامزد تهیه واکسن (OPS-DT) بود.

روش کار: بعد از کشت انبوه باکتری، LPS با فنل داغ اصلاح شده، جدا گردید. OPS نیز بعد از دیالیز و تغلیظ با اسید استیک ۲٪ 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 تزریقی داخل صفاقی IP در فواصل دو هفته‌ای انجام گرفت، سپس نمونه سرم گردآوری شد. پاسخ آنتی بادی علیه *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 به وسیله روش الایزای غیرمستقیم برای تعیین میزان آنتی بادی‌ها انجام گردید.

یافته‌ها: بعد از دومین و سومین دوز تزریق، گروه‌های واکسینه شده با OPS-DT افزایش چشم‌گیری در میزان تیتر تمام آنتی بادی‌ها علیه OPS در مقایسه با OPS غیرکونژوگه نشان دادند، این افزایش تیتر در تمام آنتی بادی‌ها، به این ترتیب بود: OPS-DT>OPS>DT. افزایش قابل ملاحظه‌ای در تیتر IgM و IgG مشاهده شد که مقدار آن‌ها به ترتیب با۶۷۰ و ۳۲۰٤ برابر بود. در زیر کلاس IgG1 به مقدار ۹۲۰ و در IgG2a، IgG2b و IgG_3 به ترتیب ۱۱۰،۹۹ و ۹۱۰ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که OPS، *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 آنتی بادی ضد (OPS) را در فرم کونژوگه با توکسوئید دیفتری افزایش داده و می‌تواند نامزد تهیه واکسنی مناسب به شمار آید.

واژه های کلیدی: *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8، OPS، واکسن کونژوگه، توکسوئید دیفتری

دریافت: ۹۳/۹/۲٤ **پذیرش:** ۹٤/۳/۵

مقدمه

باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 بیماریزای دستگاه معده‌ای و روده‌ای است که باعث اسهال یا انتروکولیت حاد در تمام دنیا می‌شود. این باسیل بی‌هوازی 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 لبنیات جدا شده است [۱]. دمای بهینه رشد آن ۲۹ درجه سلسیوس می‌باشد، تعدادی از ویژگی‌های فنوتیپی باکتری وابسته به دما می‌باشد. رشد بهینه 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 نزده و محصولات حیوانی توسط تحقیقات فراوان به طور کامل اثبات شده است [٤]. 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* O:8 با علائمی مانند:

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

اسهال و درد شکم مشخص می‌شود. اسهال به مدت ۱٤-۷ 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 مذکر و جوان شایع است. در بعضی از کشورها مثل هلند، بلژیک، کانادا و استرالیا تعداد آلودگی‌های حاصل از *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 بیشتر از عفونت‌های شیگلایی است [۶،۵]. این باکتری قادر به ایجاد لنفادنیت، سلولیت و عفونت‌های زخم، فارنژیت، سپتی‌سمی و مننژیت، آندوکاردیت، پنومونی، آبسه‌های متمرکز در کبد و طحال و استئومیلیت می‌باشد. واکنش‌های ثانویه مثل اریتمانودوزوم، گلومرولونفریت و آرتریت نیز احتمالا توسط این باکتری ایجاد می‌شود [۷،۸]. با توجه به اینکه کیت‌ها و تست‌های آزمایشگاهی مفید و کارآمدی برای تشخیص سریع این باکتری وجود ندارد، درمان‌های سریع و کارآمد صورت نمی‌گیرد. همین طور به دلیل مقاومت روز افزون به درمان آنتی بیوتیکی تا به حال واکسن کارآمدی بر علیه آن تولید نشده است [۹،۱۰]. زنجیره جانبی O [1] یا الیگوپلی ساکارید (OPS) خارجی‌ترین و آنتی‌ژنیک‌ترین بخش LPS است، که ۹۰-۸۰ درصد از آنتی‌بادی‌های تولید شده بر ضد LPS، 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، کونژوگه‌کردن 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 واکسن‌ها بسیاری از بیماری‌های پنوموکوکی و مننژیت به طور مطلوب کنترل گردیده است [۱۱]. هدف از این تحقیق طراحی واکسنی کارآمد علیه *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 بود که پتانسیل بالایی برای ایجاد سلول‌های خاطره‌ای داشته باشد.

روش کار

باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8

باکتری مذکور از مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان تهیه شد. توکسوئید دیفتری، ۶۰ عدد موش ٤ تا ۵ هفته‌ای ماده از نژاد 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 الایزا از شرکت R&D (آمریکا)، اتیل-۳- (۳- دی متیل آمینو- پروپیل) کربودیمید[2]، آدیپک اسید دی هیدرازید[3] و سایر مواد مورد نیاز از شرکت SIGMA (آمریکا) تهیه گردید.

استخراج OPS

ابتدا کلنی‌های باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 از محیط کشت مولرهینتون 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 ۰/۵ سی سی فنل اضافه شده و در بنماری ۶۰ 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 بن ماری 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 یخ سرد گردید، بعد از سانتریفیوژ مرحله فنلی جداسازی و دیالیز شد، بعد از اضافه شدن ۹/۵

[1] O-Side Chain

[2] EDAC
[3] ADH

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

سی‌سی اتانول به مدت ۲ ساعت در فریزر قرار داده شد، بعد از سانتریفیوژ برای استخراج نهایی LPS ۳ برابر حجم الکل و ۱سی سی NaCl اضافه شد و به مدت ٤۸ ساعت در فریزر قرار داده شد. بعد از یک ساعت سانتریفیوژ محلول شفاف رویی دورریخته 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 [۱۲،۱۳].

تهیه کونژوگه OPS *یرسینیاانتروکولیتیکا*O:8 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 ۰/۵ 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 ٤ ساعت در یخچال نگه‌داری گردید [۱٤،۱۵].

جمع آوری بخش حاوی مولکول کونژوگه

ابتدا ستون حاوی ژل سفارز CL-4B با محلول کلرید سدیم ۰/۲ مولار شستشو و محلول اصلی کونژوگه از ستون عبور داده شد. سپس بخش‌های جمع‌آوری 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 جمع‌آوری و با هم ادغام شدند. سپس کونژوگه‌های تهیه شده با کمک سانتریفوژ، تغلیظ و از فیلتر ۰/٤۵ میکرونی عبور داده شدند [۱۶].

واکسیناسیون و سنجش آنتی‌بادی‌های سرمی در موش

۶۰ عدد موش BALA/c به چهار گروه تقسیم شد. گروه اول برای تزریق OPS غیرکونژوگه، گروه دوم برای تزریق توکسوئید دیفتری، گروه سوم برای 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 (۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر موش). خون‌گیری از قلب موش با فواصل دو هفته‌ای پس از هر بار تزریق (هربار از ۳ موش) انجام گرفت. سپس سرم خون‌ها به وسیله سانتریفیوژ جداسازی گردید. تست الایزا برای تعیین میزان آنتی‌بادی‌های سرمی IgG1، IgG2a، IgG2b، IgG3، IgM، IgA و IgG تام انجام گرفت [۲۲-۱۹].

انجام الایزا غیرمستقیم

ابتدا OPS در بافر کربنات ۰/۰۵ مولار با pH=۹/۶ 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 ٤ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس پلیت با بافر شستشو سه بار شستشو داده شد (هر بار ۵۰ میکرولیتر). محلول بلوکه 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 ۶۰ 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 ٤۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (لازم به ذکر است برای سنجش سایر آنتی‌بادی‌های القایی نیز تمام

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

مراحل فوق تکرار و آنتی‌بادی خود مواجه شدند) [۲۳،۲٤].

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 ($p<۰/۰۱$) [۲۶].

یافته‌ها

الف) برای تخلیص مولکول‌های کونژوگه OPS-DT از مولکول‌های غیرکونژوگه آن را از ستون ژل فیلتراسیون حاوی سفاروز CL-4B عبور داده و جذب نوری فرکشن‌ها در طول موج ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر به ترتیب برای OPS و توکسوئید دیفتری 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 ١٤ روز طی سه مرحله واکسینه شدند. خون‌گیری و بررسی عیار آنتی‌بادی‌های مختلف هر دو هفته یک بار به وسیله 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 درگروه‌های مختلف به این ترتیب بود: OPS-DT> OPS>DT. با توجه به نتایج به دست آمده از طریق آزمون LSD با $p<۰/۰۱$ تمامی گروه‌های واکسینه با محلول کونژوگه OPS-DT و OPS 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 موش‌های واکسینه OPS-DT در مقایسه با OPS مشاهده شد، که این افزایش در تیتر IgM و IgG تام قابل ملاحظه بود و مقدار آن‌ها به ترتیب برابر با ۶۷۰، ٣٢٠٤ بود و در زیر کلاس IgG1 به مقدار ۹۲۰ و در IgG2a، IgG2b، IgG3 به ترتیب مقدار ۱۱۰، ۹۹ و ۹۱۰ مشاهده شد (جدول ۱).

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

	دو هفته بعد از تزریق اول				دو هفته بعد از تزریق دوم				دو هفته بعد از تزریق سوم			
آنتی‌بادی	OPS-DT[1]	OPS	DT	N.S	OPS-DT	OPS	DT	N.S	OPS-DT	OPS	DT	N.S[1]
IgGتام	۳۱۰**	۹۵*	۰	۰	۱۰۵۰**	۳۲۵*	۰	۰	۳۲۰٤**	۳۶۰*	۰	۰
IgG1	۹۰**	۶۷*	۰	۰	۳۵۰**	۱۱۱*	۰	۰	۹۲۰**	۱٤۵*	۰	۰
IgG2a	۳۵**	۲۰*	۰	۰	۷۰**	۵۰*	۰	۰	۱۱۰**	۶۸*	۰	۰
IgG2b	۲۵**	۱۸*	۰	۰	۷۵**	۲۵*	۰	۰	۹۹**	۳۹*	۰	۰
IgG3	۹۹**	۶۰*	۰	۰	٤۰۰**	۱۰۰*	۰	۰	۹۱۰**	۱۳۸*	۰	۰
IgM	۱۰۰**	۹۰*	۰	۰	۲٤۰**	۱۸۰*	۰	۰	۶۷۰**	۲۱۰*	۰	۰
IgA	۱۷**	۱۱*	۰	۰	۲۰**	۱۵*	۰	۰	۲۶**	۱۹*	۰	۰

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل با $p<۰/۰۱$

** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین OPS-DT وOPS با $p<۰/۰۱$

OPS.1= الیگوپلی ساکارید،DT= توکسوئید دیفتری، N.S= نرمال سالین

بحث

یرسینیا انتروکولیتیکا O:8 بیماریزای مشترک دستگاه گوارش انسان و حیوان است که طیف گسترده‌ای از بیماری‌های روده‌ای را در انسان به وجود می‌آورد که توسط آب و غذای خوب پخته نشده و محصولات حیوانی منتقل می‌شود [۱]. این بیماری غالبا در

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

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، *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 تهیه یک ترکیب ایمونوژن با کارایی مناسب علیه بیماری یرسینیوز بود و استفاده از خواص توکسوئید دیفتری به عنوان حامل برای اولیگوپلی ساکارید، استفاده از خواص اجوانتی OPS *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 برای القای ایمنی بیشتر به توکسوئید دیفتری بود، تا در صورت اثبات کارایی بتوان این کونژوگه را به عنوان نامزد واکسن برای بیماری یرسینیوزیس 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 ایمنی‌زایی کونژوگه تهیه شده آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* با توکسوئید کزاز به روش آمیداسیون در موش انجام دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که آنتی‌بادی‌های IgG IgM IgA, تولید شده علیه آلژینات 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 تولیدی علیه OPS به صورت کونژوگه بیش از OPS غیرکونژوگه بود به طوری که میزان تیتر IgG تولید شده علیه OPS در گروه‌های واکسینه با OPS-DT در تزریق سوم نسبت به تزریق اول از ۳۱۰ به ۳۲۰٤ افزایش نشان داد. در زیرکلاس‌های IgG3، IgG2b، 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 ایمونوگلوبین اصلی در پاسخ اولیه است و از موثرترین ایمونوگلوبین‌ها، 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 مجاری 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 گسترده‌ای برای بررسی تیتر آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه واکسن‌های کونژوگه انجام شده است. در سال ۱۹۸۶، کریز و همکاران پلی‌ساکارید مشتق‌شده از LPS *سودوموناس آئروژینوزا* با توکسوئید کزاز 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 LPS ۱۹ برابر بود، در ۸۲ درصد از داوطلبان افزایش در میزان تیتر آنتی‌بادی‌ها بیش از ٤ برابر نشان داده شد و میزان تیتر آنتی‌بادی علیه توکسوئید کزاز در ۵۶ درصد موارد بیش از ٤ برابر افزایش داشت [۲٤]. همچنین میدوینتر[1] و همکاران در مطالعه خود دریافتند که ایمنی‌زایی اندک پلی‌ساکارید را می‌توان توسط کونژوگه کردن با توکسوئید دیفتری برطرف کرد. برای این منظور بخش پلی‌ساکارید از لیپوپلی‌ساکارید باکتری *لپتوسپیرا اینتروگانس* را با توکسوئید دیفتری کونژوگه کردند، در موش‌ها شاهد افزایش حداقل

[1] Midwinter

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

۱۰ برابری آنتی‌بادی‌ها در گروه‌های واکسینه با کونژوگه OPS-DT نسبت به گروه‌های واکسینه با LPS بودند [۲۷]. در مطالعه دیگری پاسول[1] و همکاران پلی ساکارید-O *شیگلا سونئی* و *شیگلا فلکسنری* را با توکسین غیرفعال شده دیفتری (CRM 197) کونژوگه کردند. در کونژوگه میزان IgG ضد لیپوپلی ساکاریدی یک هفته پس از تزریق افزایش یافت [۲۳]. عسگری و همکاران در مطالعه خود اقدام به تهیه کونژوگه کپسول پلی‌ساکاریدی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* 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 یاوری و همکاران PRP *هموفیلوس آنفلونزا* تیپ b را با پروتئین KLH کونژوگه کردند و شاهد افزایش ایمنی زایی و فاگوسیتوزی بودند [۲۹].

[1] Passwell

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از الایزا که نشان از تولید بالای آنتی‌بادی‌های IgG، IgM و دیگر آنتی‌بادی‌ها دارد، می‌توان نتیجه گرفت که توکسوئید دیفتری به عنوان یک حامل پروتئینی با OPS، *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 به روش آمیداسیون تولید واکسنی می‌کند که در برابر بیماری یرسینیوزیس حاصل از *یرسینیا انتروکولیتیکا* O:8 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

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

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, Carnlel 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, Trokenheim 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-dependent interleukin-1 intracrine 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 pekkanenii sp. Nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2011 Oct; 61(10): 2363-7.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

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, Autenriethl 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 lipopolysacharide and polysaccharide-O conjugates to tetanus toxoid. Ph.D. thesis Tarbiat Modarres 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 06. 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- Jaberi Gh, Shapouri R, Kariminik A. Immunization of Pseudomonas aeruginosa alginate-conjugated to diphteria toxoid in mice. J Microbial World. 2013 Jun; 6(15):138-47. (Full text in Persian)

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]

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)

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-09]