

مقاله پژوهشی

تولید و بررسی اثرات محافظت‌بخش واکسن کنزوگه پروتئینی - پلی ساکاریدی در پیشگیری از عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم در موش آزمایشگاهی

دکتر نیما حسینی جزینی^۱، دکتر قربان بهزادیان نژاد^۲ و دکتر شهرام شهابی^۳

خلاصه

عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم ممکن است به شکل عفونت‌های روده‌ای یا غیرروده‌ای در دام‌ها، پرندگان، کودکان و نوزادان نارس، افراد سالم و افراد مبتلا به نقص ایمنی روی دهد. به دنبال این عفونت‌ها امکان ایجاد عوارض دائمی یا غیردائمی نظیر آندوفتالمیت، استئومیلیت، سندرم گیلین‌باره و ... در انسان وجود دارد. امروزه سویه‌های سالمونلاتیفی موریوم مقاوم به درمان از سرتاسر دنیا گزارش شده‌اند. با توجه به روند رو به افزایش عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم، امروزه این عفونت‌ها یک خطر جدی محسوب می‌شوند. هدف از این مطالعه طراحی یک واکسن مناسب برای پیشگیری از این عفونت‌ها بود. در این تحقیق زنجیره جانبی پلی ساکاریدی O سالمونلاتیفی موریوم با استفاده از روش آمیداسیون با واسطه کربودیامید به توکسوئید کزاز متصل شد و آزمایش ایمونودیفیوژن انجام شد. به دنبال تلقیح چهار گروه از موش‌های BALB/c با کنزوگه تولیدی، واکسن کشته شده، پلی ساکارید خالص و آب مقطر استریل، میزان مرگ و میر و LD50 در هر گروه تعیین شد. نتایج ایمونودیفیوژن نشان داد که شاخص‌های آنتی‌ژنیک پروتئینی و پلی ساکاریدی کنزوگه در حین گنژوگاسیون و تخلیص تخریب نشده‌اند و قادر به واکنش با آنتی‌سرم‌های مربوطه می‌باشند. مقایسه LD50 در بین چهار گروه نشان داد که در گروه مورد تزریق با کنزوگه نسبت به گروه مورد تزریق با پلی ساکارید خالص و گروه کنترل میزان LD50 به ترتیب ۱۵/۴ و ۱۱/۱۱ برابر افزایش یافته است. مشاهدات انجام شده نشان می‌دهد که واکسن کنزوگه پلی ساکارید O با توکسوئید کزاز قادر به ایجاد محافظت در برابر عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم در موش می‌باشد و در پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری موفق به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: سالمونلاتیفی موریوم، واکسن کنزوگه، پلی ساکارید O

۱- استادیار گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه ۲- دانشیار گروه میکروبی‌شناسی، ۳- دانشجوی دوره دکتری تخصصی گروه

ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت مقاله: ۱۳۸۲/۱۰/۹ دریافت اصلاحات: ۱۳۸۳/۵/۷ پذیرش مقاله: ۱۳۸۳/۶/۱۱

مقدمه

سالمونلا تیفی موریوم باسیل گرم منفی عامل ایجادکننده عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای در انسان، دام‌ها و پرندگان است. عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم اکثراً به دنبال مصرف مواد غذایی و آشامیدنی روی می‌دهد. در افراد سالم عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم اکثراً به شکل عفونت‌های روده‌ای روی می‌دهد که گاهی منجر به ایجاد اپیدمی در منطقه می‌شود. عفونت‌های خارج روده‌ای ناشی از این باکتری بیشتر در کودکان، نوزادان نارس، افراد مبتلا به نقص ایمنی، ایدز، لوسمی، آنمی سیکل سل و ... روی می‌دهد (۱۰۷، ۱۴، ۱۹).

عوامل متعددی در ویرولانسی سالمونلاتیفی موریوم نقش دارند ولی ویرولانسی باکتری عمدتاً ناشی از مقاومت نسبی لیپوپلی ساکارید باکتری نسبت به فعال‌سازی مکمل از راه فرعی است و لیپوپلی ساکارید این باکتری باعث حفاظت آن در برابر بیگانه خواری می‌شود. بنابراین لیپوپلی ساکارید مهمترین عامل تهاجم و ویرولانسی باکتری و آنتی ژن غالب آن محسوب شده و اصطلاح لیپوپلی ساکارید کپسولی به آن اطلاق می‌شود.

لیپوپلی ساکارید به علت سمی بودن نمی‌تواند به عنوان یک واکسن مناسب مورد استفاده قرار گیرد. به منظور غلبه بر این مشکل می‌توان بخش سمی لیپوپلی ساکارید (لیپید A) را از آن جدا کرد و پلی ساکارید باقی مانده را به عنوان واکسن به کار برد اما متأسفانه زنجیره جانبی پلی ساکاریدی باقی مانده ایمنی‌زایی کمی داشته و قادر نیست پاسخ ایمنی مناسب را ایجاد کند بنابراین هر دو این ملکول‌ها برای تهیه واکسن غیرقابل استفاده‌اند. این پلی ساکارید به دلیل آنکه یک آنتی ژن غیروابسته به T است پاسخ‌های ایمنی ضعیفی را برمی‌انگیزد و در نوزادان نیز به علت تأخیر در تکامل سلول‌های B ایمنی نسبت به پلی ساکاریدها دیرتر و در سنین بالاتر ظاهر می‌شود (۱۶، ۲۱).

به منظور افزایش ایمنی‌زایی پلی ساکاریدها بهترین راه، متصل نمودن پلی ساکارید به یک پروتئین ایمونوژن است و بدین ترتیب یک آنتی ژن غیروابسته به تیموس به یک آنتی ژن وابسته به تیموس تبدیل می‌شود. این نوع واکسن‌های کنژوگه پروتئین - پلی ساکارید می‌تواند

باعث تغییر کلاس آنتی‌بادی به IgG، ایجاد پاسخ‌های خاطره‌ای قوی در برابر پلی ساکارید و افزایش تمایل اتصال آنتی‌بادی‌های تولیدی به آنتی ژن پلی ساکاریدی شده و لنفوسیت‌های Thelper را به منظور کمک‌رسانی برای تولید آنتی‌بادی درگیر نمایند و نیز باعث برانگیخته شدن پاسخ ایمنی حتی در سنین پایین شوند. نکته فوق در کنترل عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم بسیار مهم است زیرا حداکثر میزان ابتلاء و مرگ و میر ناشی از سالمونلا تیفی موریوم در نوزادان و کودکان کم سن دیده می‌شود.

بنابراین واکسن‌های کنژوگه می‌توانند مقدار زیادی IgG در برابر جزء پلی ساکاریدی خود برانگیزند و مدت دوام محافظت ایجاد شده نیز نسبتاً طولانی است. همچنین این واکسن‌ها باعث برانگیختن آنتی‌بادی‌های هومورال حتی در کودکان و نوزادان می‌شوند (۸، ۱۰).

از طرفی با توجه به مقاومت باکتری به فعال شدن مکمل از راه فرعی تولید آنتی‌بادی‌های اپسونین نقش مهمی در بلعیده شدن باکتری توسط ماکروفاژها دارد و نیز کمپلکس آنتی ژن با آنتی‌بادی اختصاصی قادر است Fcγ receptor₁ را در سطح ماکروفاژها تحریک کند و متعاقباً فعالیت ماکروفاژها نیز برای کشتن سالمونلاتیفی موریوم افزایش می‌یابد (۱۲).

واکسن‌های حاوی سلول‌های کامل کشته شده به علت سمیت و ایمنی‌زایی کم چندان مناسب نبوده و واکسن‌های زنده ضعیف شده‌ای که تا به حال طراحی شده‌اند نیز به دلایل متعدد چندان قابل قبول نمی‌باشند (۹، ۱۱). در مجموع مشاهدات انجام شده نشان می‌دهد که واکسن‌های کنژوگه پلی ساکارید O با پروتئین‌های ایمونوژن در پیشگیری از عفونت‌های ناشی از سالمونلاتیفی موریوم بسیار موفق به نظر می‌رسند.

بنابراین در این پژوهش کنژوگاسیون زنجیره جانبی پلی ساکاریدی سالمونلاتیفی موریوم با توکسوئید کزاز با روش آمیداسیون با واسطه کربودیامید با استفاده از EDC (1-ethyl-3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride) صورت گرفت. به دنبال ایمونیزاسیون موش‌های BALB/c با کنژوگه تولیدی، خونگیری از موش‌ها به عمل آمد و نمونه‌های سرم جداسازی شد، ایمونودیفیوژن با انتشار دوجانبه آنتی ژن و آنتی‌بادی در ژل آگارز انجام شد.

میزان محافظت ایجاد شده در حیوانات ایمن شده با تزریق دوزهای مختلف باکتری پاتوژن بررسی و LD50 با روش Reed و Muench تعیین شد (۱۵).

مواد و روش کار

کنژوگاسیون: زنجیره جانبی پلی ساکاریدی O با برخی تغییرات ناشی از تجربه کاری با روش Chu و همکاران (۵) با توکسوئید کزاز کنژوگه شد. به طور خلاصه زنجیره جانبی پلی ساکاریدی O با غلظت ۵۰ میلی گرم در ۵ میلی لیتر آب مقطر در دمای اطاق حل شد و با استفاده از سود یک نرمال pH محلول به ۱۰/۵ رسانیده شد. ۱۲۵ میکرولیتر از محلول سیانوژن بروماید (Merck) به غلظت ۲/۰ گرم در میلی لیتر در استونیتریل (Merck) اضافه شد و مجدداً pH محلول در ۱۰/۵ تنظیم شد. پس از ۲/۵ دقیقه، ۵ میلی لیتر از محلول ۰/۵ مولار ادپیک اسید دی هیدرازید (Sigma) همراه با بیکربنات سدیم با غلظت ۰/۵ مولار اضافه شد و مجدداً pH در حد ۸/۵ تنظیم شد. سپس این مخلوط در طول شب در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد. به دنبال آن ملکول ادپیک اسید دی هیدرازید متصل به زنجیره جانبی O با استفاده از ستون حاوی سفادکس ۲۵ - G با حجم کاری ۳۰ × ۲ سانتی متر که با آب مقطر به تعادل رسیده بود تخلیص شد و فراکسیون های حاوی نمونه با هم ادغام شده و در سرما خشک شدند. ۲۰ میلی گرم از آنتی ژن تهیه شده به ۲۰ میلی گرم توکسوئید کزاز (مؤسسه رازی حصارک) اضافه شد و حجم نمونه با استفاده از سرم فیزیولوژی به ۲ میلی لیتر رسانده شد. EDC با غلظت ۰/۱ مولار افزوده شد و نمونه به مدت ۴ ساعت در حالی که روی یخ قرار داشت به هم زده شد. سپس به مدت دو روز در برابر محلول ۰/۲ مولار کلرید سدیم دیالیز شد. برای خالص سازی کنژوگه از ملکول های غیر کنژوگه از ستون سفارز 2B با حجم کاری ۱×۹۰ سانتی متر که با محلول ۰/۲ مولار کلرید سدیم به تعادل رسیده بود استفاده شد. فراکسیون های حاوی کنژوگه جمع آوری شده و با هم ادغام شدند و در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۵). اندازه گیری مقدار کلی کربوهیدرات ها با استفاده از روش فنل - سولفوریک اسید (۶) و تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد انجام شد (۳).

ایمونیزاسیون موش ها و خون گیری: موش های ماده ۸-۶ هفته ای از نژاد BALB/c از مؤسسه رازی خریداری شد و به منظور ایمونیزاسیون با $10^8 \times 1$ عدد سلول کامل کشته شده سالمونلاتیفی موریوم و یا ۱۰ میکروگرم زنجیره پلی ساکاریدی O خالص شده و یا کنژوگه، به طریقه داخل صفاقی مورد تزریق قرار گرفتند. تزریق ۳ بار در روزهای صفر و ۱۴ و ۲۸ تکرار شد. دو هفته بعد خون گیری از قلب موش ها انجام شد و سرم خون جداسازی شده و تا زمان انجام آزمایشات در ۲۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۲).

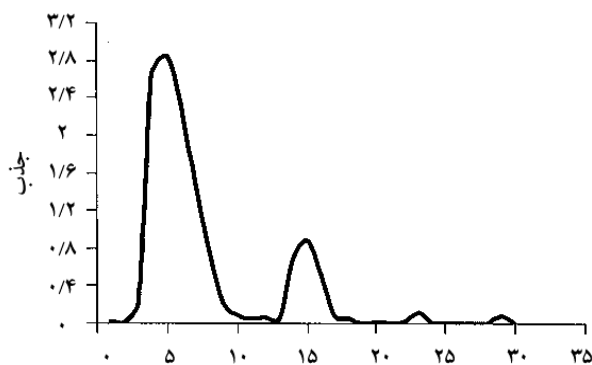
ایمونودیفیوژن: تهیه پلیت های حاوی آگارز برای انجام آزمایش انتشار دوگانه در ژل به منظور اثبات تولید آنتی بادی های سرمی بر علیه زنجیره جانبی پلی ساکاریدی O و توکسوئید کزاز با روش استاندارد صورت گرفت. پس از تهیه پلیت حاوی آگارز با غلظت ۱/۵ گرم در ۱۰۰ چاهک هایی در ژل ایجاد کرده و پس از شماره گذاری چاهک ها بر اساس الگوی طراحی شده، آنتی ژن ها یا سرم حیوانات تحت آزمایش در چاهک ها ریخته شد و پلیت ها یک تا سه روز در اطاقک مرطوب در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و از نظر تشکیل خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفتند. ژل ها چندین بار با PBS و سپس آب مقطر شستشو داده شدند تا پروتئین های آزاد و خطوط رسوبی غیر اختصاصی حذف شوند.

رنگ آمیزی خطوط رسوبی با استفاده از محلول کوماسی بریلیان بلو R-250 (Pharmacia) صورت گرفت و پس از رنگ آمیزی ژل به ظرف حاوی محلول رنگ بر (آب-اسیداسیتیک-متانول به نسبت حجمی ۵:۸:۴۲) انتقال داده شد و تا بی رنگ شدن کامل زمینه در محلول رنگ بر باقی ماند. سپس سطح ژل با کاغذ صافی خیس پوشانده شده و در حرارت اطاق خشک شد.

به منظور تعیین تسبزیایی کنژوگه تولیدی از آزمون تسبزیایی در خرگوش (۱۳) و به منظور تعیین سمیت و استریلیتی کنژوگه تولیدی از آزمون های استاندارد استفاده شد (۲۰).

روش انجام آزمایش محافظت حیوان ایمن در برابر دوز عفونی باکتری بیماری زا: پس از ایمونیزاسیون ۴۸ عدد موش BALB/c با کنژوگه، سلول کامل کشته شده و یا زنجیره جانبی پلی ساکاریدی O و یا آب مقطر استریل، هر

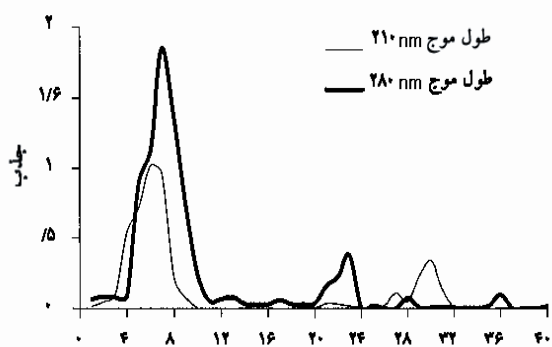
کنژوگه نشده است. مقدار پلی ساکارید و پروتئین کنژوگه نشده در فراکسیون‌های مربوط به حجم خالی به ترتیب با روش فنل - سولفوریک اسید و برادفورد تعیین شد و کارایی کنژوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای توکسوئید کزاز ۸۰/۵٪ و برای مشتق ادپیک اسید دی هیدرازید - پلی ساکارید ۳۸٪ محاسبه شد. (جدول ۱).



شماره فراکسیون

نمودار ۱: طیف جذبی فراکسیون‌های مختلف حاصل از ستون سفادکس G-25 در طول موج ۲۱۰ نانومتر.

همان‌طور که مشاهده می‌شود منحنی دارای ۲ قله است. قله اول در قسمت مربوط به حجم خالی است که با توجه به افزایش وزن زنجیره جانبی پلی ساکاریدی پس از کنژوگاسیون با ادپیک اسید دی هیدرازید، مربوط به کنژوگه بوده و قله دوم که حاوی مقدار کمتری پلی ساکارید است حاوی زنجیره جانبی O کنژوگه نشده است.



شماره فراکسیون

نمودار ۲: طیف جذبی فراکسیون‌های مختلف حاصل از ستون سفارز 2B را در طول موج‌های ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که کنژوگه در فراکسیون‌های حجم خالی از ستون خارج شده است.

یک از گروه‌های تحت آزمایش و کنترل به ۶ گروه هر یک حاوی ۸ موش تقسیم شدند. یک هفته پس از آخرین تزریق، سالمونلا تیفی موریوم بیماری‌زا روی محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار (Merck) کشت داده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اتوگناداری شد. از کلنی‌های حاصل رقت‌های متوالی در سرم فیزیولوژی که به ترتیب حاوی 10^8 ، 10^7 ، 10^6 ، 10^5 ، 10^4 ، 10^3 و 10^2 عدد باکتری در فاز لگاریتمی می‌باشند تهیه و به هر یک از گروه‌های ۸ تایی تحت آزمایش و یا کنترل به صورت داخل صفاقی ۰/۲ سی‌سی تزریق گردید. پس از ۲۱ روز موش‌ها مورد بررسی قرار گرفته و میزان مرگ و بقاء یادداشت و مقادیر LD50 بر اساس روش رید و مینچ تعیین شد (۱۵).

نتایج

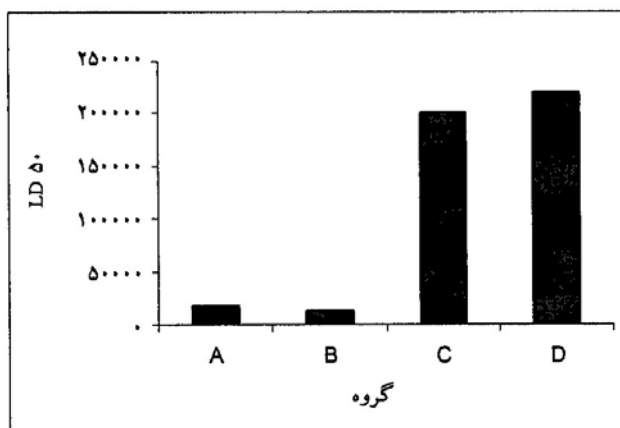
کنژوگاسیون زنجیره جانبی پلی ساکاریدی O با ادپیک اسید دی هیدرازید: پس از لیوفلیزاسیون فراکسیون‌های حاوی زنجیره O متصل به ادپیک اسید دی هیدرازید حاصل از ستون سفادکس G-25، مقدار زنجیره O متصل به ادپیک اسید دی هیدرازید تعیین شد. به ازاء ۵۰ میلی‌گرم زنجیره جانبی O تزریق شده به ستون، ۴۳/۵ میلی‌گرم کنژوگه در حجم خالی از ستون خارج شد (نمودار ۱).

همان‌طور که در نمودار ۱ دیده می‌شود ملکول‌های کنژوگه نشده پلی ساکاریدی به علت سبک‌تر بودن در فراکسیون‌های پس از حجم خالی از ستون سفادکس G-25 خارج شدند.

کنژوگاسیون مشتق ادپیک اسیدی هیدرازید - پلی ساکارید با توکسوئید کزاز: نتایج مربوط به کنژوگاسیون پلی ساکارید با توکسوئید کزاز در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار دیده می‌شود قله‌های مربوط به جذب در حجم خالی در طول موج‌های ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر بر روی هم منطبق است که نشان دهنده حضور ملکول کنژوگه شده در فراکسیون‌های مربوط به حجم خالی می‌باشد. نمودار قرائت شده در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارای قله کوچک دومی نیز هست که مربوط به توکسوئید کزاز کنژوگه نشده است و نیز نمودار قرائت شده در طول موج ۲۱۰ نانومتر نیز دارای قله کوچک دومی است که مربوط به زنجیره پلی ساکاریدی O

آزمون تب‌زایی، سمیت و استریلیتی: نمونه کنژوگه طراحی شده به منظور انجام آزمایشات تب‌زایی، سمیت و استریلیتی به بخش فرآورده‌های بیولوژیک انستیتو پاستور ایران ارسال شد و بر اساس دستورالعمل استاندارد به مدل آزمایشگاهی تزریق شد. نتایج به دست آمده نشان داد که نمونه در دوز قابل تزریق عاری از ماده تب‌زا، غیرسمی و عاری از حضور باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی و قارچ بوده و لذا قابل تزریق می‌باشد.

آزمایش محافظت حیوان ایمن در برابر دوز عفونی باکتری بیماری‌زا: نتایج مربوط به این آزمایش در جدول ۲ و نمودار ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج می‌توان دریافت که میزان مرگ و میر در موش‌هایی که با کنژوگه یا جسم کشته شده سالمونلاتیفی موریوم مورد تزریق قرار گرفته بودند در مقایسه با موش‌های گروه کنترل یا موش‌هایی که زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O را دریافت نموده بودند کاهش یافته و LD₅₀ در دو گروه اول افزایش یافته است. بنابراین کنژوگه تولیدی قادر به ایجاد محافظت نسبی در برابر عفونت ناشی از سالمونلاتیفی موریوم در موش آزمایشگاهی است (جدول ۲ و نمودار ۳).



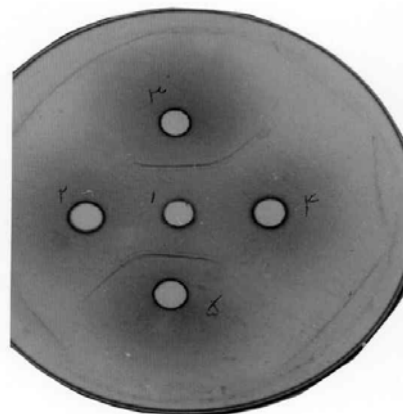
نمودار ۳: مقایسه LD₅₀ محاسبه شده در چهار گروه

همچنان‌که مشاهده می‌شود LD₅₀ گروه مورد تزریق با کنژوگه (C) نسبت به گروه کنترل (B) و گروه مورد تزریق با زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O (A) به ترتیب ۱۵/۴ و ۱۱/۱۱ برابر افزایش یافته است در گروه مورد تزریق با جسم کشته شده باکتری LD₅₀ (D) نسبت به گروه B و A به ترتیب ۱۶/۹ و ۱۲/۲ افزایش یافته است. در گروه D نسبت به گروه C LD₅₀ افزایش قابل توجهی نشان نمی‌دهد.

جدول ۱: درصد کارایی کنژوگاسیون بر حسب وزن پلی‌ساکارید و پروتئین کنژوگه شده و غیرکنژوگه

وزن (میلی‌گرم) / نوع ترکیب	کنژوگه	غیرکنژوگه	کارایی
ADH-Ochain	۷/۶	۱۲/۴	٪۳۸
پروتئین	۱۶/۱	۳/۹	٪۸۰/۵

آزمایش انتشار دوگانه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در ژل اگارز: نتایج مربوط به آزمون انتشار دوگانه آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در ژل اگارز در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنان‌که مشاهده می‌شود توکسوئید کزاز و کنژوگه هر دو با آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه توکسوئید کزاز واکنش داده‌اند. همچنین کنژوگه و زنجیره جانبی O هر دو با آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه جسم باکتری واکنش داده‌اند. با توجه به نتایج حاصل می‌توان نتیجه گرفت که ساختار آنتی‌ژنیک توکسوئید کزاز و زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O در حین کنژوگاسیون تخریب نشده است و قادر به واکنش با آنتی‌بادی‌های مربوطه می‌باشند.



شکل ۱: آزمون ایمنودیفیوژن، چاهک شماره ۱ (کنژوگه)، چاهک شماره ۲ (پلی‌ساکارید خالص)، چاهک شماره ۳ (آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه توکسوئید کزاز)، چاهک شماره ۴ (توکسوئید کزاز)، چاهک شماره ۵ (آنتی‌بادی تهیه شده بر علیه سلول کشته شده سالمونلاتیفی موریوم). کلیه آنتی‌ژن‌ها به حجم ۵۰ میکرولیتر و با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر به چاهک‌ها تزریق شدند.

جدول ۲: میزان محافظت ایجاد شده در برابر عفونت ناشی از دوزهای مختلف سالمونلاتیفی موریوم PTCC1735 در موش

ایمن شده

گروه	دوز	۱۰ ^۲	۱۰ ^۳	۱۰ ^۴	۱۰ ^۵	۱۰ ^۶	۱۰ ^۷
درصد بقا در گروه A	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۱۲/۵	۰
درصد بقا در گروه B	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۸۷/۵	٪۵۰	٪۲۵	۰	۰
درصد بقا در گروه C	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۸۷/۵	٪۶۲/۵	٪۶۲/۵	٪۵۰	٪۱۲/۵
درصد بقا در گروه D	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۶۲/۵	٪۷۵	٪۳۷/۵	۰

تعداد موش‌ها در هر گروه = ۸ عدد

- A تزریق زنجیره پلی ساکارییدی O، $LD50 = 1/8 * 10^4$: گروه A
 B (گروه کنترل) تزریق آب مقطر استریل، $LD50 = 1/3 * 10^4$: گروه B
 C تزریق کنژوگه، $LD50 = 2 * 10^0$: گروه C
 D تزریق جسم کامل کشته شده سالمونلا تیفی موریوم، $LD50 = 2/2 * 10^0$: گروه D

بحث

در این تحقیق به منظور کنژوگاسیون توکسوئید کزاز با پلی ساکارید آنتی ژن O از آدپیک اسید دی هیدرازید به عنوان فاصله گذار (spacer) استفاده شد. این ملکول ۶ کربنه بین ملکول‌های کربوهیدرات و پروتئین قرار می‌گیرد. واسطه آدپیک اسید دی هیدرازید-پلی ساکارید تولید شده قادر است به گروه‌های آمین موجود در پروتئین‌ها به طور کوالانسی متصل شود. Schneerson و همکاران از ۶ نوع متفاوت Spacer برای کنژوگاسیون پروتئین‌های مختلف با پلی ساکارید کپسول هموفیلوس آنفلونزا استفاده نمودند و نشان دادند که تنها آدپیک اسید دی هیدرازید می‌تواند با کارایی بالایی باعث اتصال کوالانسی کپسول به پروتئین‌های مختلف شود (۱۷).

در بررسی حاضر به ازای هر مول از زنجیره جانبی پلی ساکارییدی O حدود ۸ مول از آدپیک اسید دی هیدرازید مورد استفاده قرار گرفت. این نسبت در مطالعات Schneerson و همکاران ۲۰ برابر و در بررسی‌های Watson و همکاران ۷/۵ برابر بوده است (۱۷، ۲۲). به هر حال گزارشات مختلف نشان می‌دهد که انتخاب نسبت مناسب از آدپیک اسید دی هیدرازید و پلی ساکارید در افزایش کارایی کنژوگاسیون پروتئین با پلی ساکارید نقش دارد (۲، ۱۷، ۲۲).

به منظور کنژوگاسیون توکسوئید کزاز با پلی ساکارید از واکنش آمیداسیون با واسطه کربودیامید استفاده شد. EDC یک کربودیامید با حلالیت بسیار بالا در آب است و حضور آن در محیط باعث تشکیل پیوند کربوکسیل با آمین می‌شود و بازده محصول را تا ۹۰٪ افزایش می‌دهد. EDC در ۴-۴/۵ pH دارای حداکثر فعالیت است (۱۸). Shneerson و همکاران بهترین pH برای فعالیت EDC را ۴/۷ و Byrd و Kadis بین ۴/۵ تا ۵ ذکر نموده‌اند (۴، ۱۷)، به هر حال ما بهترین نتیجه را در pH=۵/۸ به دست آوردیم.

مقدار پروتئین و پلی ساکارید کنژوگه شده در فراکسیون‌های مربوط به حجم خالی به ترتیب با روش فنل- سولفوریک اسید و برادفورد تعیین شد و کارایی کنژوگاسیون بر حسب درصد وزنی برای توکسوئید کزاز ۸۰/۵٪ و برای آدپیک اسید دی هیدرازید- پلی ساکارید ۳۸٪ محاسبه شد. محاسبات انجام شده بر حسب وزن مولی ملکول‌های مورد نظر نشان می‌دهد که در ساختار کنژوگه تولیدی به ازاء هر ملکول توکسوئید کزاز دو ملکول زنجیره جانبی پلی ساکاریدی O حضور دارد.

کارایی کنژوگاسیون در مطالعه Watson و همکاران ۳۵٪ به ازاء وزن زنجیره پلی ساکاریدی بوده است. در بررسی Shneerson و همکاران کارایی کنژوگاسیون بر حسب وزن پروتئین مورد استفاده حدود ۹۰٪ تخمین زده

می‌توان نتیجه گرفت که کنژوگه تولیدی باعث تبدیل این پلی‌ساکارید که یک آنتی‌ژن غیروابسته به تیموس است به یک آنتی‌ژن وابسته به تیموس شده است و بنابراین آنتی‌ژن O متصل به توکسوئید کزاز قادر به تحریک سیستم ایمنی و ایجاد محافظت در مواجهه با باکتری زنده پاتوژن است.

در گروه مورد تزریق با سالمونلاتیفی موریوم کشته شده با حرارت در مقایسه با گروه مورد تزریق با کنژوگه LD50 به طور محسوسی افزایش نیافته است (۱/۱ برابر) که نشان می‌دهد که اکثر پاسخ‌های محافظت‌بخشی که به دنبال تزریق جسم سلولی کشته شده در موش BALB/c ایجاد می‌شوند با تزریق کنژوگه نیز ایجاد شده‌اند و قادر به محافظت موش در مواجهه با باکتری‌های زنده پاتوژن می‌باشند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به سمیت بالای واکسن‌های کشته شده و کارایی کم واکسن‌های خوراکی زنده ضعیف شده، انجام سایر آزمایشات تکمیلی در مورد این نوع واکسن‌ها و استفاده از آنها برای پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری در اولویت قرار دارد.

شده است. بنابراین نتایج ما با نتایج به دست آمده توسط این محققین مطابقت دارد (۱۷،۲۲).

نتایج ایمونودیفیوژن نشان می‌دهد ساختار آنتی‌ژنیک توکسوئید کزاز و زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی O در حین کنژوگاسیون تخریب نشده و قادر به واکنش با آنتی‌بادی‌های مربوطه می‌باشند و نیز با توجه به اینکه کنژوگه تولیدی با استفاده از ستون سفارز 2B از ملکول‌های پلی‌ساکاریدی و پروتئینی غیرکنژوگه تفکیک شده است، می‌توان نتیجه گرفت که این دو ملکول به طور کوالانسی به هم متصل شده‌اند.

تزریق ۳ دوزاز کنژوگه تولیدی (هر دوز ۱۰ میکروگرم)، موش‌های تحت آزمایش را در مواجهه داخل صفاقی با سالمونلاتیفی موریوم زنده پاتوژن محافظت کرده و LD50 را نسبت به گروه کنترل و گروه مورد تزریق با پلی‌ساکارید خالص به ترتیب ۱۵/۴ و ۱۱/۱۱ برابر افزایش داد. بررسی‌های انجام شده نشان داده است که زنجیره جانبی پلی‌ساکاریدی تخلیص شده سالمونلاتیفی موریوم قادر به تحریک تولید آنتی‌بادی در موش نمی‌باشد و بنابراین محافظت بخش نیست. پس

Summary

Production and Investigation of the Effects of Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccine in Prevention of *Salmonella Typhimurium* Infections in Mouse Model

Jazani N.H., Ph.D.,¹ Behzadiannejad Gh, Ph.D.² and Shahabi Sh., MD.³

1. Assistant Professor, Microbiology Department, Medical School, Orumieh University of Medical Sciences and Health Services, Orumieh, Iran 2. Associate Professor, Microbiology Department, 3. PhD. Student of Immunology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

S.typhimurium is a gram negative bacterium causing serious enteric or extraintestinal infections in human, cattle and birds. These kinds of infections may lead to some permanent or nonpermanent complications like endophthalmitis, Guillain-Barre syndrome and osteomyelitis. Multi-resistant strains of *S.typhimurium* have been reported from several countries, and these infections are a major public health problem throughout the world. The aim of the present study was to develop a conjugate vaccine for prevention of *S.typhimurium* infections. For this purpose, polysaccharide side chain was conjugated with tetanus toxoid by carbodiimid mediated amidation method. Immunodiffusion was performed in agarose gel. Four groups of BALB/c mice were selected and immunized with heat killed *S.typhimurium*, purified polysaccharide, polysaccharide side chain-tetanus toxoid conjugate and sterilized distilled water and the role of each antigen in protection against infection with pathogenic *S.typhimurium* were investigated. Animals were challenged by intraperitoneal injections. The 50% lethal dose (LD50) was determined on the 21st post challenge day by Reed and Muench method. Immunodiffusion results showed that the conjugate reacted with heat killed whole cell vaccine antiserum and tetanus toxoid antiserum. Three injections of conjugate caused protection against intraperitoneal challenge. In conjugate immunized group LD50

increased 15.4 and 11.11 fold in comparison to control group and polysaccharide side chain immunized group respectively. Results showed that polysaccharide side chain-tetanus toxoid conjugate injected in 3 doses is very protective in mice and can increase the LD50 of immunized animals significantly in comparison to both O antigen vaccinated and control groups.

Key Words: *S.typhimurium*, Lipopolysaccharide, Conjugate Vaccine
Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2004; 11(4): 219-227

References

1. Arda IS, Ergin F, Varan B, Demirhan B, Aslan H and Ozyaylali I. Acute abdomen Caused by *Salmonella typhimurium* infection in children. *J Pediatr Surg* 2001; 36 (12): 1849-52.
2. Bergquist C, Lagergard T, Lindblad M and Holmgren J. Local and systemic antibody responses to dextran-cholera toxin B subunit conjugates. *Infect Immun* 1995; 63(5):2021-2025.
3. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
4. Byrd W, Kadis S. Preparation, characterization, and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Infect Immun* 1992; 60(8):3042-3051.
5. Chu CY, Liu BK, Watson D *et al.* Preparation, characterization and immunogenicity of conjugates composed of the O-specific polysaccharide of *Shigella dysenteriae* type1 (*Shiga's bacillus*) bound to tetanus toxoid. *Infect Immun* 1991; 59(12): 4450-8.
6. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28:350-356.
7. Eaton EE, Dobrozycski J, Loas R, Laddis D and Fennelly GJ. Nontyphoidal *Salmonella* bacteremia and pneumonia as the initial manifestation of human immunodeficiency virus infection in a four – year – old Child. *AIDS Patient Care STDS* 2002; 16(6): 247-50.
8. Guttormsen HK, Sharpe AH, Chandraker AK, Brigtsen AK, Sayegh MH and Kasper DL. Cognate Stimulatory B-cell-T-cell interactions are Critical for T-cell help recruited by glycoconjugate vaccines. *Infect Immun* 1999; 67(12): 6375-84.
9. Mitov I, Denchev V and Linde K. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral Vaccines of *Salmonella typhimurium*: auxothrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine* 1992; 10 (1): 61-6.
10. Mond JJ, Lees A and Snapper CM. T-cell independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 655-692.
11. Mukkur TK, McDowell GH, Stocker BA and Lascelles AK. protection against experimental Salmonellosis in mice and sheep by immunization with aromatic-dependent *Salmonella typhimurium*. *J Med Microbiol* 1987; 24(1): 11-19.
12. Paul W: Immunity to intracellular bacteria. In: Fundamental Immunology. Vol. 3, 4th ed., Philadelphia, Lippincott-Raven, 1998; PP1335-1372.
13. Pyrogen test, In:United States Pharmacopoeia 23 rd, Revision, U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, M.D., D. 1995; 1718-19.
14. Rahman H. Some aspects of molecular epidemiology and Characterisation of *Salmonella typhimurium* isolated from man and animals. *Indian J Med Res* 2002; 115: 108-12.
15. Reed LJ and Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-497.
16. Robbins JB and Schneerson R. Polysaccharide-protein Conjugates: A new generation of Vaccines. *J infect Dis* 1990; 161(5): 821-832.

17. Schneerson R, Barrera O, Sutton A and Robbins JB. Preparation, Characterization and Immunogenicity of Haemophilus Influenzae type b polysaccharide-protein Conjugates. *J Exp Med* 1980; 152(2): 361-376.
18. Sehgal D and Vijay IK. A Method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Anal Biochem* 1994; 218(1): 87-91.
19. Spieckermann D, Luticken R and Goertz B. *Salmonella* meningitis in adults: a case of *Salmonella typhimurium* infection. *Infection* 1973; 1(3): 178-80.
20. Toxicity test, In: United States Pharmacopoeia 23 rd, Revision, U.S. Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, M.D., D. 1718, 1995.
21. Valtonen VV. Mouse Virulence of *Salmonella* Strains: the effect of different Smooth-type O Side-chains. *J Gen Microbiol* 1970; 64(3): 255-268.
22. Watson DC, Robbins JB and Szu SC. Protection of mice against *Salmonella typhimurium* with an O-Specific polysaccharide-protein Conjugate Vaccine. *Infect Immun* 1992; 60(11): 4679-86.