

Comparative evaluation of immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccine in two strains of BALB/c and DBA/2 mice: a preclinical study

Farhoudi, R.¹, Doroud, D.^{2*}, Javdani Shahedin, G.², Hedayati, M.³

1- Assistant Professor, Department of Quality Control, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

3- Ph.D. Graduate, Department of Quality Control, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

*Corresponding author's email: d_doroud@yahoo.com

(Received: 2022/2/2 Accepted: 2022/6/1)

Abstract

Streptococcus pneumoniae is easily transmitted from humans to animals and causes pneumonia, especially in horses. Extensive human vaccination prevents transmission of the disease to the equine host. The immunogenicity of a vaccine is evaluated by various methods. The aim of this study was to design a test to evaluate the immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccine as part of pre-clinical studies of vaccine production. After culturing *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F in blood agar medium, the obtained colonies were labeled using fluorescence dye. On the other hand, the serum of BALB/c and DBA/2 mice immunized with pneumococcal conjugate vaccine was collected to determine antibodies with phagocytosis properties against *Streptococcus pneumoniae*. After exposure of the serum dilutions with the labeled bacteria, the phagocytic ability of bacteria by serum opsonins (opsonophagocytosis) was read by adding mouse macrophage cells using flow cytometry. In both strains, the percentage of cells in the serum that phagocytosed the bacterium decreased with decreasing serum dilution. Opsonophagocytic titers of 128 and 64 were reported in BALB/c and DBA/2 mice respectively. Contrastingly, the results of flow cytometry were significantly different from that of manual colony count test ($r = 0.89$, $p \leq 0.001$). According to the results of the present study, the BALB/c strain of mice was a better host to determine the efficacy of the vaccine. Also, the use of flow cytometry was more advantageous than manual assay method. As a result, the data obtained from this study brings us a step closer to producing an effective vaccine.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Flow cytometry, Horse, *Streptococcus pneumoniae*, Vaccine.

"مقاله پژوهشی"

DOI: 10.30495/JVCP.2022.1951537.1352

ارزیابی مقایسه‌ای ایمنی‌زایی واکسن کونزوگه پنوموکوک در دو سویه موش آزمایشگاهی BALB/c و DBA/2: مطالعه پیش‌بالینی

رامین فرهودی^۱، دلارام درود^{۲*}، گلشید جاودانی‌شاهدین^۲، محمدحسین هدایتی^۳

۱- استادیار بخش کنترل کیفیت، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۲- استادیار مجتمع تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳- دانش‌آموخته دکترای تخصصی، بخش کنترل کیفیت مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: d_doroud@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۱۱)

چکیده

استرپتوکوک پنومونیه به راحتی از انسان به حیوانات منتقل شده و باعث پنومونی به خصوص در اسب می‌شود. واکسیناسیون گسترده انسان از انتقال این بیماری به میزبان اسب جلوگیری می‌کند. ایمنی‌زایی یک واکسن توسط روش‌های مختلف ارزیابی می‌شود. هدف این مطالعه، طراحی آزمونی جهت سنجش ایمنی‌زایی واکسن کونزوگه پنوموکوک به صورت بخشی از مطالعات پیش‌بالینی تولید واکسن است. پس از کشت استرپتوکوک پنومونیه سروتیپ 19F در محیط بلاد آگار، کلونی‌های به دست آمده با استفاده از رنگ فلورسنس نشاندار شدند. از طرفی سرم موش‌های BALB/c و DBA/2 که با ۳ دز واکسن کونزوگه پنوموکوک ایمن شده بودند، به منظور تعیین آنتی‌بادی‌هایی با خاصیت بیگانه‌خواری علیه استرپتوکوک پنومونیه جمع‌آوری شد. پس از مجاورت رقت‌های سرمی با باکتری نشان‌دار، توانایی بیگانه‌خواری باکتری‌ها توسط اپسونین‌های موجود در سرم (اپسونوفاگوسیتوز) با اضافه کردن ماکروفاژ موشی توسط فلوسایتومتری خوانش شد. در هر دو سویه موش با کاهش رقت سرمی درصد سلول‌هایی در سرم که باکتری را فاگوسیتوز کردند کاهش پیدا کرد. تیتراپسونوفاگوسیتیک در موش BALB/c ۱۲۸ و در موش DBA/2 ۶۴ گزارش گردید. از طرفی نتایج فلوسایتومتری با نتایج آزمون شمارش دستی کلونی‌های زنده تفاوت معنی‌داری داشت ($t=0/89$ ، $p \leq 0/001$). طبق نتایج مطالعه حاضر مشخص شد سویه موش BALB/c میزبان بهتری به منظور انجام تعیین کارایی واکسن است. از طرفی استفاده از روش فلوسایتومتری مزایای بیشتری نسبت به روش سنجش دستی دارد. در نتیجه نتایج این مطالعه ما را یک قدم دیگر به تولید واکسن موثر نزدیک‌تر می‌کند.

کلیدواژه‌ها: استرپتوکوک پنومونیه، اسب، واکسن، فلوسایتومتری.

مقدمه

جمعیت حیوانی مانع از انتقال این بیماری به انسان می‌گردد، در مورد این باکتری واکسیناسیون جمعیت انسان علاوه بر کاهش مرگ‌ومیر ناشی از پنومونی در انسان، باعث قطع چرخه انتقال به میزبان حیوانی خود یعنی اسب می‌شود. لذا یکی از واکسن‌هایی که ساخت آن در برنامه آینده انستیتو پاستور قرار گرفته است واکسن کونژوگه علیه *استرپتوکوکوس پنومونیه* است (Timoney, 2004).

واکسن کونژوگه این باکتری شامل کپسول پنوموکوک اتصال‌یافته به یک پروتئین حامل است که رابطه مستقیمی در کاهش فرم‌های IPD دارد (Dockrell et al., 2012; Chulmin et al., 2017). مطالعات پیش‌بالینی با هدف مشخص کردن ویژگی‌های درون‌تنی و برون‌تنی واکسن‌های کاندید از جمله موارد مرتبط با سلامت و کارایی واکسن می‌باشند (Stern, 2020). استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی در تحقیقات واکسن مرحله انتقال از مطالعات پیش‌بالینی را به مطالعات بالینی تسهیل می‌کند (Chiavolini et al., 2008). در توسعه واکسن پنوموکوک ارزیابی ایمنی‌زایی آن با استفاده از آزمون الیزا است (Saeland et al., 2000). با وجود این، افراد بالغ که به طور عمده سطوح آنتی‌بادی‌های پنوموکوکی بالای این مقدار را دارند، هم‌چنان به عفونت‌های پنوموکوکی مستعد هستند. لذا آزمون الیزا به منظور ارزیابی دقیق ایمنی‌زایی واکسن‌های پنوموکوک در افراد بالغ کفایت لازم را ندارد و ترجیح داده می‌شود که ظرفیت حفاظتی آنتی‌بادی‌های پنوموکوکی به طور مستقیم اندازه‌گیری شود (Sorensen et al., 2019). از آنجایی‌که زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی کپسول پنوموکوک، این باکتری را از بیگانه‌خواری در

استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*) باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری، فاقد اسپور و بدون حرکت است (Masomian et al., 2020). این باکتری عامل اصلی بیماری پنومونی بوده و طیف وسیعی از عفونت‌ها مانند سینوزیت، اوتیت، باکتری می و آبسه‌های مغزی را در انسان و اسب ایجاد می‌کند (Andrew et al., 2016). کپسول پلی‌ساکاریدی این باکتری که با پیوند کووالان به پپتیدوگلیکان دیواره سلولی متصل شده است از لحاظ ایمنولوژیک در بیش از ۹۰ نوع پنوموکوک، مشخص و متمایز است (Anttila et al., 1999). کپسول پنوموکوکی ایمنوژن بوده و علیه آن آنتی‌بادی حفاظتی تولید می‌شود و به نظر می‌رسد مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده واگیری پنوموکوک می‌باشد (Daniels et al., 2016; Park et al., 2017). این واقعیت که عوامل بیماری‌زا می‌توانند از انسان به حیوان منتقل شوند، شاید چندان شگفت‌آور نباشد. تخمین زده می‌شود که ۶۱/۶ درصد از منابع بیماری‌زای انسانی قادرند طیف وسیعی از حیوانات را آلوده کنند. به این شکل از بیماری‌ها که انسان عفونت را به حیوانات دیگر منتقل می‌کند، زئونوز معکوس (reverse zoonosis) گفته می‌شود (Jia et al., 2021). *استرپتوکوکوس پنومونیه* در دامپزشکی مخصوصاً در ارتباط با بیماری در میزبان اسب است. انتقال گسترده این باکتری از جمعیت انسانی به گله‌های اسب ثابت شده است. لذا واکسیناسیون گسترده در جمعیت انسان و اسب به نوعی این چرخه را قطع خواهد کرد (Chanter et al., 1997). از آنجایی‌که برخلاف بیماری‌های هاری که واکسیناسیون گسترده در

تهیه (PTCC NO 1240) و در مجاورت یخ خشک به آزمایشگاه منتقل و در دمای منهای ۸۰ درجه سلسیوس محیط تریپتو کیس سوی براث/آگار (trypticase soy broth/agar) ساخت شرکت مرک (Merck, Germany) استفاده گردید. پس از تهیه محیط کشت و افزودن خون دفیبرینه گوسفند به آن، زیر هود لامینارفلو کلاس دو، ۵-۶ میلی‌لیتر از محیط فوق به ویال حاوی باکتری منتقل و بلافاصله نیم میلی‌لیتر از آن به پلیت حاوی محیط کشت مذکور منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO₂ انکوبه شد.

- نشان‌دار کردن باکتری استرپتوکوک پنومونیه: برای نشان‌دار کردن باکتری از رنگ فلورئورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) (fluorescein isothiocyanate) ساخت شرکت سیگما (Sigma, USA) طبق دستورالعمل زیر استفاده گردید. بعد از اینکه باکتری در محیط اختصاصی خود رشد کرد، به پلیت حاوی محیط بلاد آگار (blood agar) منتقل و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO₂ انکوبه گردید. سپس کلونی‌های جدا شده به داخل محیط مایع تاد هویت (Todd-Hewitt) حاوی نیم درصد عصاره مخمر تلقیح و به مدت ۳-۴ ساعت انکوبه گردید. باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰×g خارج و سپس در ۵ میلی‌لیتر بافر بیکربنات (0.1 M NaHCO₃ [pH 8.0]) به حالت تعلیق درآمدند. به منظور نشان‌گذاری، پنجاه میکرولیتر از رنگ FITC و ۱۰ میلی‌گرم از محلول دی متیل سولفوکساید (dimethyl sulfoxide) با هم ترکیب شده و سپس این ترکیب به مدت یک ساعت در مجاورت

حضور اپسونین‌ها (اپسونوفاگوسیتوز) که مکانیسم اصلی پاکسازی پنوموکوک از ریه است مصون می‌کند، مدل‌های حیوانی و آزمون‌های اپسونوفاگوسیتوز به منظور ارزیابی ظرفیت حفاظتی آنتی‌بادی‌های عملکردهی توسعه یافته‌اند (Romeo et al., 2003; Papadatou et al., 2019). این اولین مطالعه‌ای است که نتایج حاصل از آن به تدوین دستورالعمل مشترک به منظور ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن کونژوگه پنوموکوک در شرایط درون‌تنی می‌انجامد. از جمله اهداف دیگر این مطالعه، بهینه کردن میزان سلول هدف و باکتری در آزمون فاگوسیتوز، مقایسه یک سویه جدید موش کوچک آزمایشگاهی با سویه رایج و تعیین حداقل تیتراپسونوفاگوسیتیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- طراحی مطالعه: مطالعه حاضر از نوع کارآزمایی بالینی شاهددار اتفاقی می‌باشد، تمام مراحل اجرایی این پژوهش از شهریور سال ۱۳۹۹ تا مهر سال ۱۴۰۰ در مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران انجام گردید.

- تهیه واکسن کونژوگه پنوموکوک: واکسن پنوموکوک کونژوگه (pneumococcal conjugate) ساخت شرکت فایزر (Patent No. (PCV13)(vaccine) WO 2013191459) از انستیتو پاستور ایران تهیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲ تا ۸ درجه سلسیوس نگهداری شد.

- تهیه، احیا و کشت باکتری استرپتوکوک پنومونیه: سروتیپ 19F [(ATCC 49619)(IBRC-M 10819)] باکتری استرپتوکوک پنومونیه از مرکز ذخایر ژنتیکی

اصلی، سلول‌ها هر سه روز یکبار پاساژ داده شدند و یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری به منظور تشخیص آلودگی میکوپلاسمایی تهیه گردید.

- **آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):** به منظور اطمینان از عدم وجود آلودگی میکوپلاسمایی در کشت حاوی سلول J774A.1 و تداخلات احتمالی آن با آزمون اپسونوفاگوسیتوز، آزمون تشخیص میکوپلاسمای به روش PCR با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ انجام شد. ژنوم (DNA) میکوپلاسماهای موجود در کشت‌های سلولی J774A.1 و سویه استاندارد میکوپلاسمای (به عنوان کنترل مثبت) با استفاده از کیت تجاری Column Spin 10-EZkit DNA Genomic (Canada, Inc Basic Bio) بر اساس پروتکل کیت، استخراج شد. ترکیبات لازم جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول ۲ آمده است (سینا کلون). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر (UK, Warrington, Biosystems Applied, 2720 ABI) انجام گردید. برنامه مورد استفاده اختصاصی میکوپلاسمای مطابق جدول ۳ انجام گردید. بررسی محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در زیر دستگاه ماوراء بنفش انجام گرفت. اندازه محصول PCR با استفاده از مارکر ۵۰ زوج باز (bp) ساخت شرکت فرمنتاز کشور آلمان (Fermentas, Germany) مشخص گردید.

سوسپانسیون باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد CO₂ انکوبه شد. در نهایت با افزودن ۱ درصد از پارافمالدئید ۲ درصد یک شب تا صبح فرآیند ثبوت باکتری تکمیل شد. سپس باکتری‌های نشان‌دار شده شش بار در ۲۰ میلی‌لیتر بافر اپسونوفاگوسیتوز توسط سانتریفیوژ شسته شدند تا زمانی که هیچ رنگی در محلول رویی مشاهده نگردید. باکتری‌های نشان‌دار شده تا روز آزمون در دمای ۴ درجه سلسیوس و به دور از نور نگه‌داری شدند.

- **تهیه و کشت رده سلولی ماکروفاژهای موشی (J774A.1) (Murine Macrophage like cell):** جهت کشت سلول رده J774A.1 از محیط dulbecco modified eagle medium (DMEM) و آنتی‌بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین ساخت شرکت نوآوری زیستی گویا (INOCLON) و همچنین از سرم جنین گاوی (fetal bovine serum, FBS) ساخت شرکت گیپکو (Gibco, Germany) استفاده گردید. یک هفته بعد از دریافت سلول، روند یخ‌زدایی سلول انجام پذیرفت و سلول‌ها به فالكون حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت انتقال داده شدند. شمارش سلول‌ها زنده‌مانی ۸۵ درصد را تایید کرد. سپس در یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری به میزان $6 \times 10^5 - 4$ سلول در هر میلی‌لیتر حاوی محیط کشت DMEM، ۱ درصد ال-گلوتامین، ۲۰ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال شده و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شد. به منظور سازش سلول‌ها با شرایط آزمایشگاه قبل از انجام آزمون

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص آلودگی کشت سلول به مایکوپلاسما

نام پرایمر	(5'-3') توالی الیگونوکلئوتید	اندازه باند (جفت باز)	منبع
F3-Myco B3-Myco	GCG ATG GCT AAC TAT GTC CC TCG CCT TTG GTG TTC TTC C	۲۱۹	Soheyli <i>et al.</i> , 2017

جدول ۲- نوع و مقدار مواد و محلول‌های مورد استفاده در یک واکنش PCR

محل	غلظت	حجم مورد استفاده (میکرولیتر)
بافر PCR	۱۰X	۲
dNTP (mM)	۱۰	۱
پرایمر F3 (μm)	۵	۱
پرایمر B3 (μm)	۵	۱
DNA پلیمراز (u/μl)	۵	۱
آب مقطر دیونیزه	-	۱۴
DNA نمونه	-	۵
حجم کلی		۲۵

جدول ۳- برنامه PCR اختصاصی جنس مایکوپلاسما

نام مرحله	دما (سلسیوس)	مدت (ثانیه)
دنا توراسیون	۹۳	۲۰
اتصال	۶۰	۲۰
طولیل شدن رشته الگو	۷۲	۳۰

پزشکی انجام گردید (کد تایید اخلاق پژوهش IR.PIL.REC.1399.032). از موش‌های گروه درمان، قبل از تزریق واکسن خون‌گیری از طریق سینوس پشت کاسه چشمی (retro orbital sinus) صورت پذیرفت و سرم آن‌ها جدا گردید و تا روز آزمون، سرم‌ها در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. تزریق واکسن PCV در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ روز پس از خون‌گیری به صورت داخل صفاقی به میزان ۰/۵ میلی لیتر انجام گردید. ۱۰ روز پس از تزریق آخرین دز واکسن، نمونه سرم همانند مرحله قبل از تزریق واکسن، جدا و تا زمان انجام آزمون در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری

- گروه‌های مطالعه: حیوانات استفاده شده در این آزمون از نوع موش سفید آزمایشگاهی همخون از دو سویه BALB/c (۲۲ سر) و DBA/2 (۲۲ سر) همگی ماده با وزن ۱۵ تا ۲۰ گرم از بخش علوم حیوانات مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور تهیه شدند. موش‌ها از هر سویه به دو گروه شاهد (۲ سر) و درمان (۲۰ سر) تقسیم و در قفس‌های جداگانه در محیطی فاقد پاتوژن نگهداری شدند. تمامی مداخلات جراحی و مراقبت‌های قبل و بعد از تزریق و خون‌گیری مطابق با دستورالعمل‌های کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش

گردید (شکل ۱). بعد از جمع‌آوری خون با استفاده از گاز استریل به مدت ۱ دقیقه با فشار ملایم عمل خون‌بندی را انجام گردید. تقریباً از هر سر موش بین ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر خون در میکروتیوب‌های از قبل آماده جمع‌آوری شده و منظور جداسازی سرم به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.



شکل ۱- خون‌گیری از سینوس پشت کاسه چشمی موش BALB/c با استفاده پپیست پاستور تحت بیهوشی عمومی

شد. به موش‌های گروه شاهد به جای واکسن، آب تزریقی استریل تزریق و خون‌گیری به منظور تهیه سرم انجام گردید. نحوه خون‌گیری و جداسازی سرم بدین صورت بود که پس از تزریق داروی بی‌هوشی کتامین+ زایلازین (عرفان دارو، ایران)، موش به پهلو چپ قرار داده شده و با فشار ملایم پپیست پاستور به ملتحمه، جریان خون بیرون‌آمده داخل میکروتیوپ جمع‌آوری

سرمی به کف پلیت ۹۶ خانه‌ای دیگری افزوده شد، سپس به میزان ۵۰ میکرولیتر باکتری نشان‌دار شده به چاهک‌های حاوی رقت‌های سرم (1×10^7 باکتری در هر چاهک) اضافه شد و پلیت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس با دور rpm ۲۰۰ بصورت افقی تکان داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، محتویات پلیت فوق به پلیت حاوی سلول اضافه شده و پلیت نهایی که حاوی سلول، باکتری و رقت‌های سرمی بود به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور (shaker incubator) با دور rpm ۲۰۰ بصورت افقی و ۳۰ دقیقه دیگر در انکوباتور معمولی قرار گرفت. در پلیت آزمون سه چاهک به منظور کنترل سلول (تنها حاوی سلول J774A.1) در نظر گرفته شد. به منظور خوانش نمونه‌ها در دستگاه

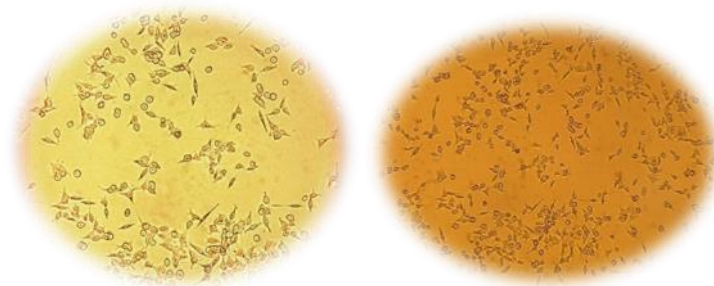
آزمون اپسونوفاگوسیتوز با استفاده از فلوسایتومتری: به منظور یکسان‌سازی تعداد باکتری‌ها در هر چاهک، ابتدا لوله آزمایش حاوی استوک باکتری نشان‌دار به غلظت 2×10^8 رسید (لذا غلظت باکتری در هر چاهک 1×10^7 در نظر گرفته شد). از طرفی رقت‌سازی نمونه‌های سرمی به صورت سریالی ($1/2$ ، $1/4$ ، $1/8$ ، $1/16$ ، $1/32$ ، $1/64$ ، $1/128$ و $1/256$) با استفاده از بافر اپسونوفاگوسیتوز در میکروتیوپ انجام گردید. به منظور بهینه‌سازی نسبت بین سلول موثر (J774A.1) و سلول هدف (باکتری نشان‌دار) پلیت ۹۶ خانه با میزان 10^4 سلول موثر در هر چاهک در نظر گرفته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. در این فاصله ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های

در این مرحله انجام شد. تیتراپسونوفاگوسیتوز به صورت عکس رقتی که در آن ۵۰ درصد یا بیشتر مرگ کلونی‌ها در مقایسه با شمارش اولیه رخ دهد، گزارش گردید.

- **تحلیل آماری داده‌ها:** تجزیه و تحلیل داده‌های حاصله، با استفاده از نرم‌افزار SPSS-18 انجام شد. از ضریب همبستگی پیرسون (Pearson's product moment correlation coefficient) به منظور اثبات همبستگی بین دو روش استفاده شد. ارزش p -value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. تفاوت بین داده‌های جفت توسط paired t -test مشخص شد. فاصله اطمینان ۹۵ درصد به عنوان میانگین تیتراهندسی تخمین زده شد.

یافته‌ها

- **کشت سلول J774A.1:** نتایج کشت حاکی از رشد مناسب سلول داشت. سلول‌های ماکروفاژ موشی تقریباً هر سه روز یک بار کف فلاسک را پر کردند (شکل ۲).



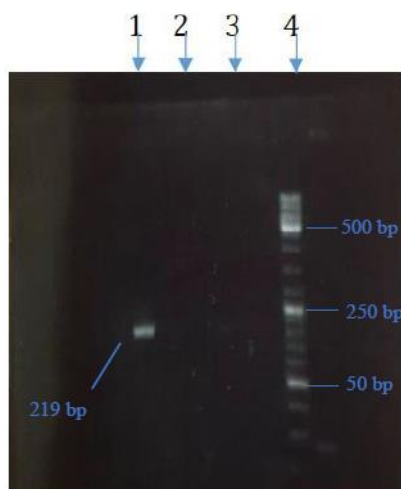
شکل ۲- تصویر سلول‌های J774A.1 روز اول (راست) و سوم (چپ) پس از پاساژ

کشت سلولی عاری از میکوپلازما است. کنترل مثبت مطابق انتظار یک باندها با طول ۲۱۹ جفت باز در ژل آگارز ایجاد نمود (شکل ۳).

فلوسایتومتری محتویات هر چاهک توسط بافر اپسونوفاگوسیتوز به حجم یک میلی‌لیتر رسید و تا زمان خوانش در تاریکی و روی یخ نگه‌داری شد. نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتر PARTEC مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر نمونه حداقل ۳۰۰۰ سلول خوانش شد. رنگ FITC در طول موج ۴۹۴ ساطع شده و سیگنال فلورسینس سلول‌های J774A.1 زنده در طول موج ۵۱۸ اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل توسط نرم‌افزار Flow Jo™ Basic Tutorial آنالیز گردید.

- **روش سنجش دستی کلونی‌های زنده:** به منظور بررسی همبستگی بین دو روش اپسونوفاگوسیتوز بر پایه فلوسایتومتری و روش سنجش دستی کلونی‌های زنده، یک شمارش اولیه از تعداد باکتری‌های زنده در هر چاهک به ثبت رسیده و پس از اضافه کردن رقت‌های سرمی، مخلوط باکتری و سرم به پلیت حاوی سلول اضافه شده و پلیت نهایی به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰ rpm بصورت افقی و ۳۰ دقیقه در انکوباتور معمولی قرار گرفت. شمارش کلونی‌های زنده

- **بررسی حضور میکوپلازما در سوسپانسیون سلولی:** با استفاده از آزمون PCR و عدم مشاهده باندها ۲۱۹ bp در نمونه سوسپانسیون سلولی می‌توان نتیجه گرفت که



شکل ۳- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز. ستون ۱- کنترل مثبت (مایکوپلاسما). ستون ۲- کنترل منفی (آب مقطر). ستون ۳- نمونه سوپانسیون سلول J774A.1 ستون ۴- مارکر ۵۰ زوج باز (فرمتاس). (آگارز ۱/۵ درصد)

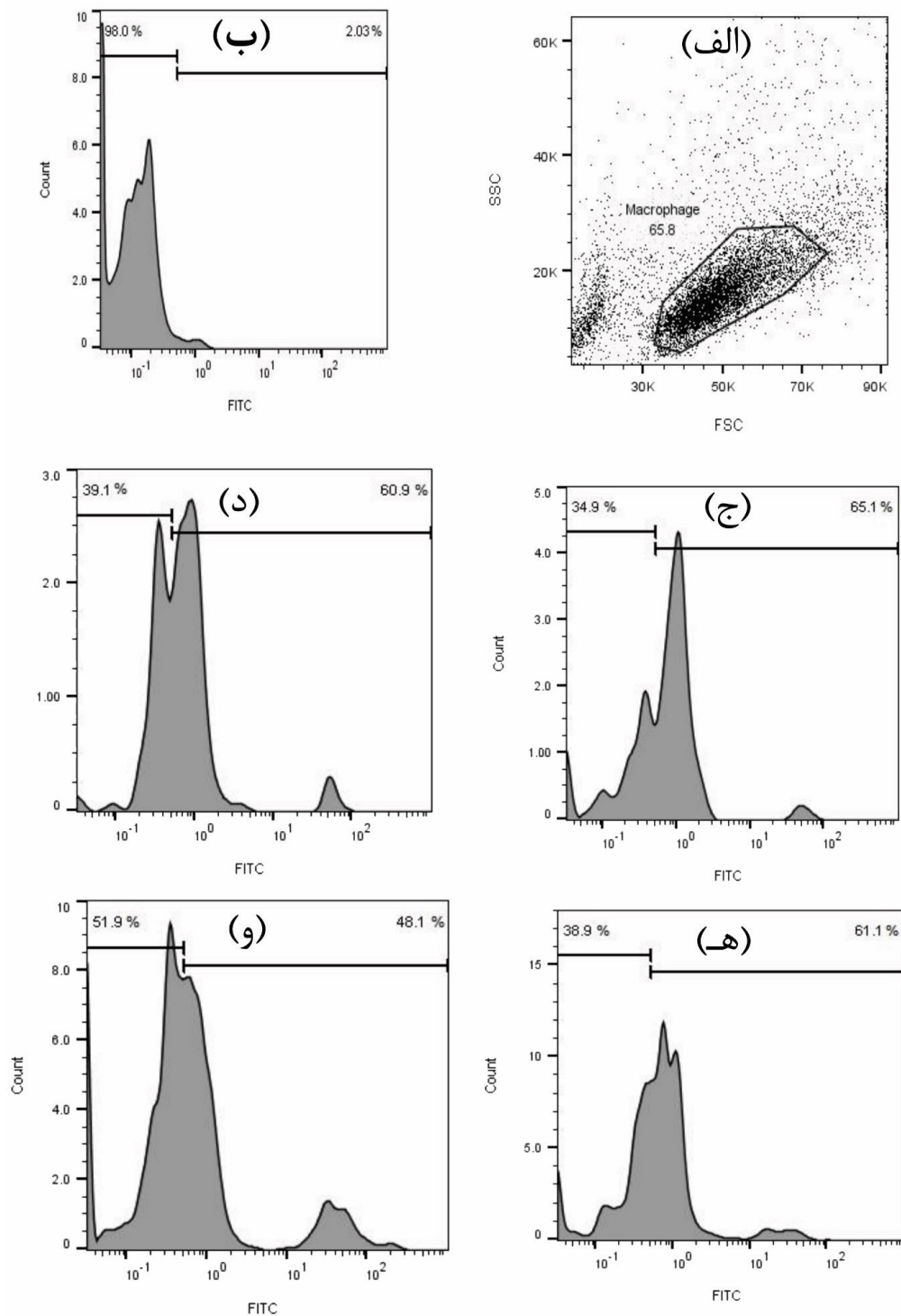
بیانگر پیچیدگی‌های درون سلولی (side scatter) (SSC) است. خوانش نمونه‌های گروه شاهد و درمان روی کانال FL1 که مطابق با طول موج رنگ FITC است، صورت گرفت. در مورد نمودار ۱ (ب تا ی) و نمودار ۲ (ب تا ی)، درصد و سطح زیر منحنی در سمت چپ بیانگر درصد جمعیت سلولی J774A.1 بدون فعالیت اپسونوفاگوسیتیک و درصد و سطح زیر منحنی در سمت راست بیانگر درصد جمعیت سلولی J774A.1 با فعالیت اپسونوفاگوسیتیک می‌باشد. همانطور که انتظار می‌رفت در گروه موش‌های شاهد سویه BALB/c (نمودار ۱-ب) که واکنشی دریافت نکرده بودند، ۹۸ درصد سلول‌ها و در گروه موش‌های شاهد سویه DBA/2 ۹۷ درصد جمعیت سلولی فاقد رنگ فلورسینس بودند (نمودار ۲-ب). نمودار ۱ (ج تا ی) بیانگر درصد فعالیت اپسونوفاگوسیتیک سلول‌های J774A.1 در حضور ۸ رقت سریالی سرم موش BALB/c بعد از تزریق واکسن است که به ترتیب

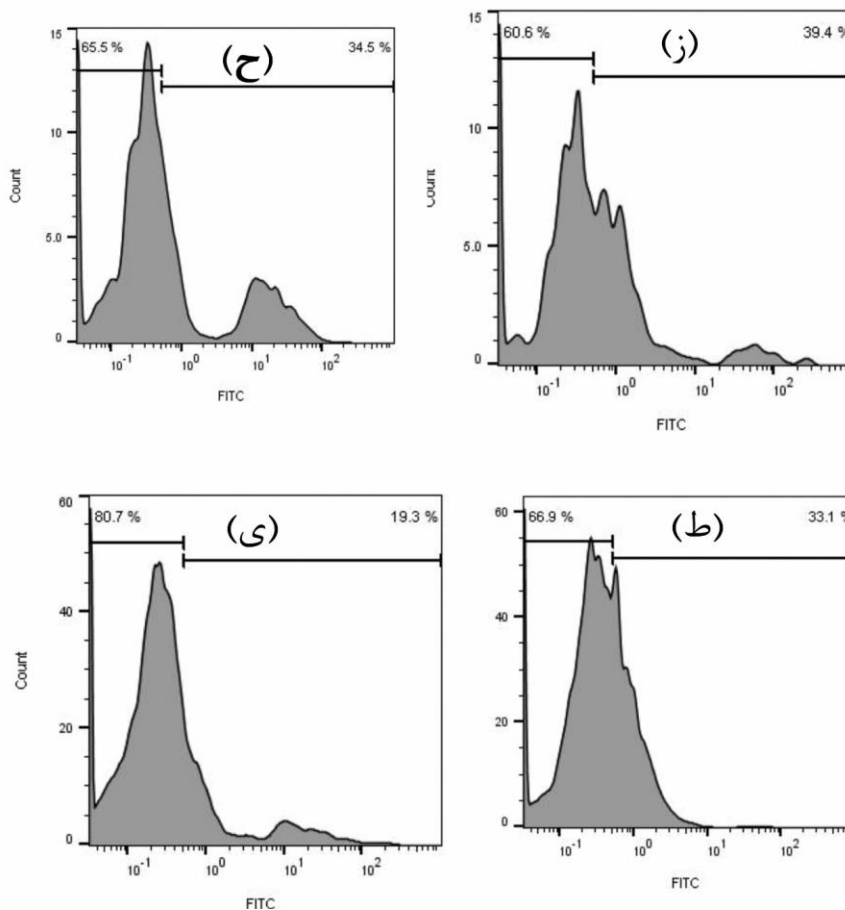
- **زنده‌مانی باکتری:** کشت باکتری‌ها پس از نشان‌دار شدن نشان از عدم وجود باکتری زنده داشت که حاکی از موفقیت‌آمیز بودن فرآیند نشان‌دار و فیکس شدن باکتری بود.

- **اختصاصی بودن آزمون اپسونوفاگوسیتوز فلوسایتومتريک:** نمودار ۱ فعالیت آنتی‌بادی‌های عملکردی سرم موش‌های BALB/c و نمودار ۲ سرم موش‌های DBA/2 علیه سروتیپ 19F/ستریپتوکوک پنومونیه را در حضور سلول‌های J774A.1 نشان می‌دهد. قبل از خوانش نمونه‌های اصلی ابتدا باید ناحیه سلول‌های مورد مطالعه (ماکروفاژها) مشخص شود. این کار با دادن نمونه کنترل سلول به دستگاه مشخص شد (نمودار ۱-الف) و (نمودار ۲-الف). ناحیه جمعیت سلولی که اطراف آن با خطوط مشکی مشخص شده (ناحیه خاکستری) جمعیت زنده تکی از سلول‌های J774A.1 را نشان می‌دهد. محور افقی بیانگر اندازه سلول (forward scatter) (FSC) و محور عمودی

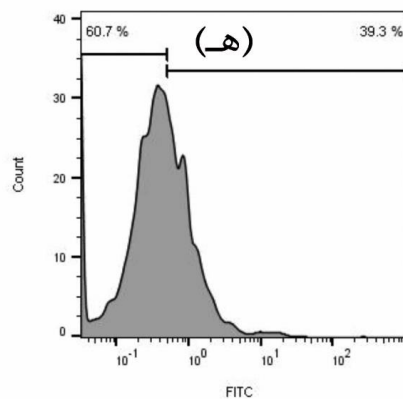
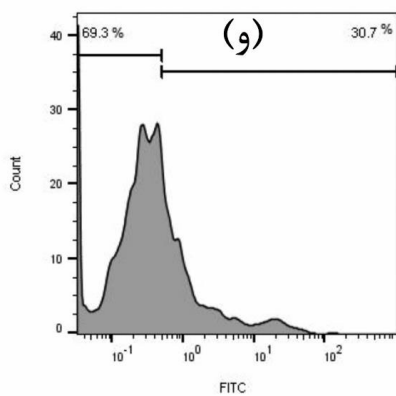
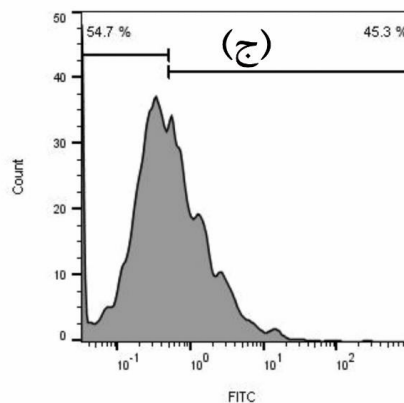
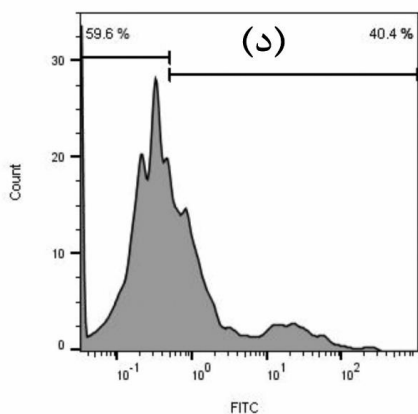
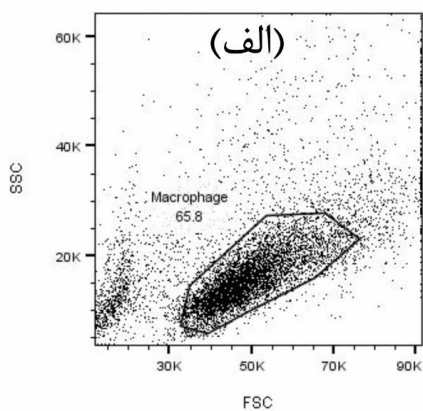
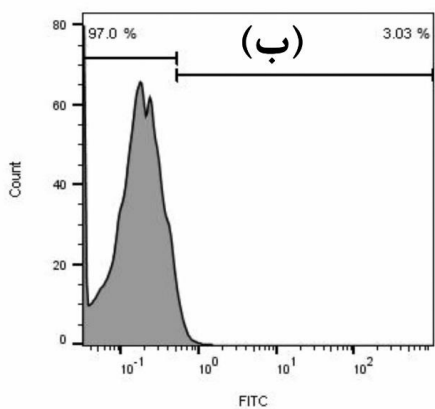
سرم)، درصد سلول‌هایی که باکتری را فاگوسیتوز کردند نیز کاهش پیدا کرد. حداکثر درصد جذب باکتری نشان‌دار توسط سلول J774A.1 در مورد هر دوسویه موش در رقت سرمی ۱/۲م رخ داد. (۶۵ درصد در موش BALB/c و ۴۵ درصد در موش DBA/2).

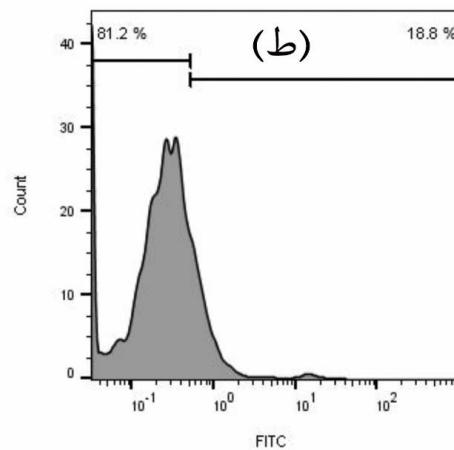
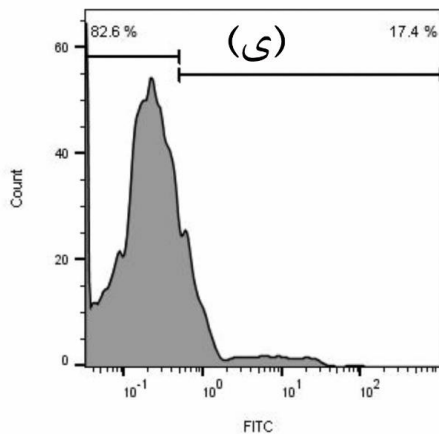
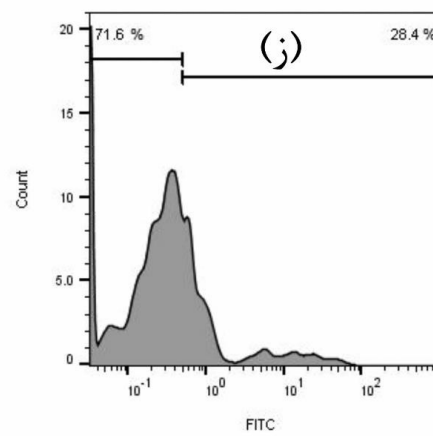
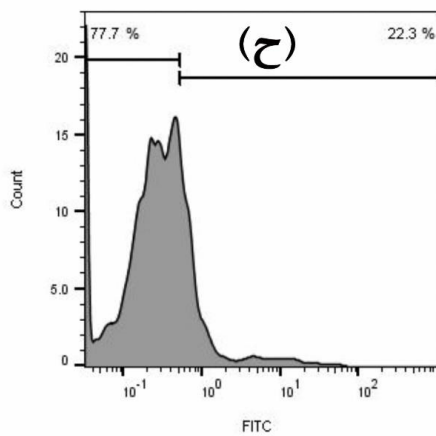
مربوط به رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۶۴، ۱/۳۲، ۱/۱۲۸ و ۱/۲۵۶ می‌باشد. نمودار ۲ (ج تا ی) نیز بیانگر درصد فعالیت اپسونوفاگوسیتیک سلول‌های J774A.1 در حضور ۸ رقت سریالی سرم در موش DBA/2 بعد از تزریق واکسن است. در هر دوسویه موش با کاهش رقت‌های سرمی (کاهش آنتی‌بادی‌های عملکردی در





نمودار ۱- آنالیز فلوسایتمتری رقت‌های سرم موش BALB/c قبل و بعد از واکسن در حضور سلول‌های J774A.1. (الف) ناحیه جمعیت سلولی که اطراف آن با خطوط مشکی مشخص شده (ناحیه خاکستری) جمعیت زنده تکی از سلول‌های J774A.1 را نشان می‌دهد (کنترل سلولی). (ب) هیستوگرام بیانگر نمونه سرم قبل از واکسن در رقت ۱/۸ می‌باشد. (درصد سمت چپ هر شکل بیانگر درصد سلول‌های J774A.1 بدون فعالیت اپسونوفاگوسیتیک و درصد سمت راست بیانگر درصد جمعیت سلولی J774A.1 فلورسنس می‌باشد. (ج تا ی) هیستوگرام بیانگر نمونه‌های سرم بعد از واکسن در رقت ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸ و ۱/۲۵۶ می‌باشد.





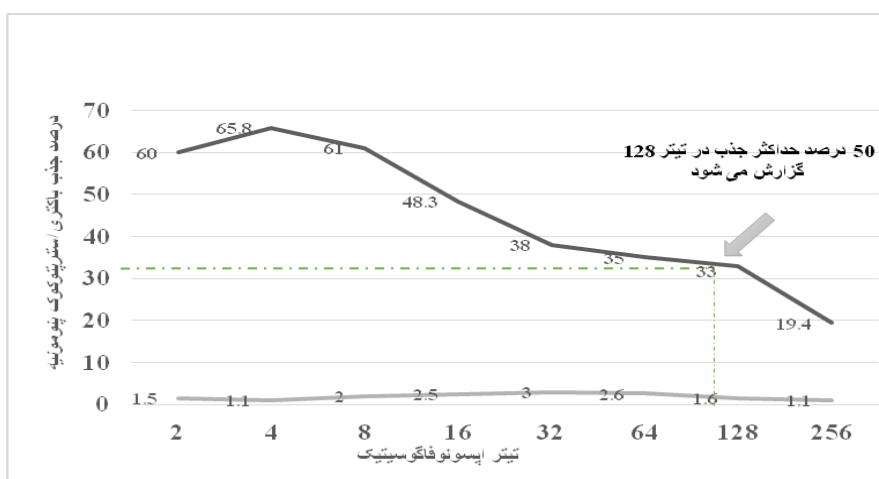
نمودار ۲- آنالیز فلوسایتومتری رقت‌های سرم موش DBA/2 قبل و بعد از واکسن در حضور سلول‌های J774A.1.. (الف) ناحیه جمعیت سلولی که اطراف آن با خطوط مشکی مشخص شده (ناحیه خاکستری) جمعیت زنده تکی از سلول‌های J774A.1 را نشان می‌دهد (کنترل سلولی). (ب) هیستوگرام بیانگر نمونه سرم قبل از واکسن در رقت ۱/۸ می‌باشد. (درصد سمت چپ هر شکل بیانگر درصد سلول‌های J774A.1 بدون فعالیت اپسونوفاگوسیتیک و درصد سمت راست بیانگر درصد جمعیت سلولی J774A.1 فلورسنس می‌باشد. (ج تا ی) هیستوگرام بیانگر نمونه‌های سرم بعد از واکسن در رقت ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸ و ۱/۲۵۶ می‌باشد.

معیار 1 ± 65 (نمودار ۳) و در موش DBA/2 10 ± 44 (نمودار ۴) گزارش گردید. منحنی فعالیت اپسونوفاگوسیتیک سلول‌های J774A.1 در رقت ۸ سرمی قبل (منحنی خاکستری) و بعد از واکسن (منحنی سیاه) در موش BALB/c در نمودار ۳ و در موش DBA/2 در نمودار ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که از این دو منحنی مشخص است تیتراپسونوفاگوسیتیک در موش BALB/c معادل ۱۲۸ (عکس رقت ۱/۱۲۸ ام)

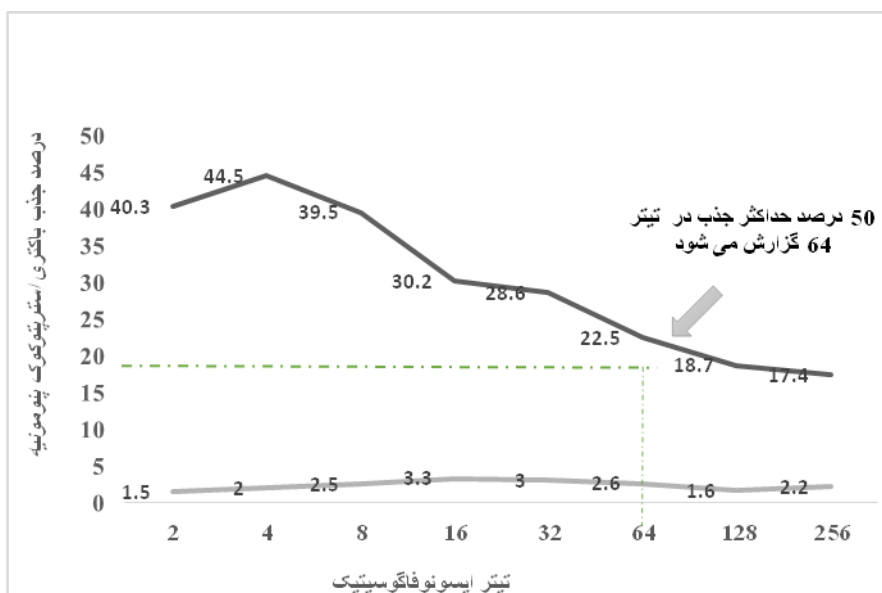
-**تعیین تیتراپسونوفاگوسیتیک:** تیتراپسونوفاگوسیتیک به صورت عکس رقت سرمی است که در آن بیشتر از ۵۰ درصد باکتری‌ها توسط فاگوسیتوز سلول‌های J774A.1 جذب می‌شوند. تیتراپسونوفاگوسیتیک با جذب فاگوسیتیک کمتر از ۲۰ درصد به عنوان منفی تلقی شده و دارای تیترا کمتر از ۴ می‌باشند. حداکثر درصد جذب باکتری توسط سلول‌های J774A.1 در سرم پس از واکسیناسیون در موش BALB/c با میانگین انحراف

کمترین درصد جذب باکتری نشان‌دار شده با FITC توسط سلول‌های J774A.1 در رقت سرمی ۱/۲۵۶ در هر دو سویه موش BALB/c و DBA/2 می‌باشد که نشان از کاهش شدید آنتی‌بادی‌های عملکردی در این رقت می‌باشد.

و در موش DBA/2 معادل ۶۴ (عکس رقت ۱/۶۴ ام) است (فلش‌ها). از آنجایی که درصد جذب فاگوسیتیک در نمونه‌های سرمی قبل از واکسیناسیون برای هر دو سویه کمتر از ۸ بود تیتراپسونوفاگوسیتیک، منفی گزارش می‌شود (منحنی خاکستری). در گروه درمان



نمودار ۳- منحنی رقت فعالیت اپسونوفاگوسیتیک در نمونه‌های سرمی پس از واکسن (سیاه) و نمونه‌های سرمی قبل از واکسن (خاکستری) در موش BALB/c. تیتراپسونوفاگوسیتیک به صورت عکس رقت سرمی است که در آن بیشتر از ۵۰ درصد باکتری‌ها توسط فاگوسیتوز سلول‌های J774A.1 جذب می‌شوند (۱۲۸) (فلش).



نمودار ۴- منحنی رقت فعالیت اپسونوفاگوسیتیک در نمونه‌های سرمی پس از واکسن (سیاه) و نمونه‌های سرمی قبل از واکسن (خاکستری) در موش DBA/2. تیتراپسونوفاگوسیتیک به صورت عکس رقت سرمی است که در آن بیشتر از ۵۰ درصد باکتری‌ها توسط فاگوسیتوز سلول‌های J774A.1 جذب می‌شوند (۶۴) (فلش).

(GMT) به دست آمده توسط آزمون فلوسایتومتريک در نمونه‌های پس از واکسن بالاتر از آزمون شمارش دستی بود. اگر چه این تفاوت معنی‌دار نبود ($p=0/05$). میانگین تیتراژ هندسی نمونه‌های قبل از واکسن در هر دو روش بسیار نزدیک هم بود.

همبستگی دو روش اپسونوفاگوسیتوز بر پایه فلوسایتومتريک و روش سنجش دستی کلونی‌های زنده: همان‌گونه که در جدول ۴ مشخص است، نتایج حاصل از آزمون فلوسایتومتريک همبستگی خوبی با آزمون شمارش دستی کلونی‌های زنده داشت ($p \leq 0/001$)، میانگین تیتراژ هندسی (geometric mean titer) ($t=0/89$)

جدول ۴- همبستگی دو روش اپسونوفاگوسیتوز بر پایه فلوسایتومتريک و روش سنجش دستی کلونی‌های زنده در نمونه‌های سرمی قبل و بعد از واکسن

همبستگی	میانگین تیتراژ هندسی (GMT)						سروتیپ / استرپتوکوک پنومونیه	
	روش شمارش دستی کلونی		روش فلوسایتومتريک					
	Slope	P value	r value	بعد	قبل	بعد		قبل
	۰/۸۳	۰/۰۰۱ >	۰/۸۹	۱۱۲	۶	۱۲۰	۷	19F

استرپتوکوک پنومونیه یک عامل بیماری‌زای مهم در انسان است، همچنین می‌تواند باعث ایجاد پنومونی در اسب‌ها نیز شود (Whatmore *et al.*, 1999). با توجه به گزارشات متعدد انتقال این باکتری از انسان به اسب‌های مسابقه، ارزش بالای این اسب‌ها و بیماری‌زایی مهم این باکتری در نوع انسان، مراحل تولید واکسن علیه استرپتوکوک پنومونیه در اولویت شرکت‌های واکسن‌سازی دنیا و نیز ایران قرار گرفت (Turner *et al.*, 2017) از جمله موارد مطرح در تهیه یک واکسن، کارایی آن واکسن است که معمولاً با آزمون‌های درون‌تنی به اثبات می‌رسد. در مطالعه حاضر پس از تزریق واکسن پنوموکوک به دو سویه موش همخون، ایمنی‌زایی واکسن با دو روش فلوسایتومتريک و شمارش دستی ارزیابی شد.

با در نظر داشتن این نکته که به جز شامپانزه‌ها، تنها میزبان طبیعی باکتری استرپتوکوک پنومونیه، انسان است، مدل‌های آزمایشگاهی زیادی در ارزیابی کارایی

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت بیماری‌زایی استرپتوکوک پنومونیه در دامپزشکی در ارتباط با اسب‌هایی است که بیشترین تماس را با انسان دارند. گزارش‌های متعددی پنومونی و مشکلات دستگاه تنفسی فوقانی را در این اسب‌ها منتشر کرده‌اند. در مطالعه جیندرس و همکاران در سال ۲۰۱۷، سه جدایه از سروتیپ ۳ / استرپتوکوک پنومونیه از اسب‌های مسابقه مبتلا به علائم تنفسی فوقانی جدا گردید. آن‌ها زمانی متوجه اهمیت موضوع شدند که این جدایه‌ها از نوع ژنوتیپ‌های مقاوم به دارو بود (Ginders *et al.*, 2017). واتمور و همکاران در سال ۱۹۹۹ مجموعه‌ای از جدایه‌های پنوموکوک انسانی و اسبی را از سروتیپ ۳ / استرپتوکوک پنومونیه با استفاده از آنالیز چندریختی طولی قطعات بریده‌شده (restriction fragment length polymorphism) جدا کردند. آن‌ها اشاره به این موضوع داشتند که اگر چه

اپسونوفاگوسیتوز وجود دارد: کشتن و جذب. آزمون هایی با فرمت کشتن، کلونی‌هایی که بعد از مجاورت باکتری با سرم ایمن شده و سلول فاگوسیتیک زنده می‌مانند را می‌شمارند که متحمل زمان طولانی (دو روز) و تغییر پذیری زیاد نسبت به روش جذب می‌باشد در صورتی که در آزمون دوم، جذب ذرات هدف اپسونیزه شده (در اینجا باکتری) توسط فلوسایتومتری سنجش می‌شود که با صرف زمان کمتر و تغییر پذیری کمتر در نتایج همراه می‌باشد. لذا آزمون اپسونوفاگوسیتیک برپایه فلوسایتومتری یک روش جایگزین سریع و تکرارپذیر نسبت به روش رایج شمارش دستی کلونی های زنده باکتریایی است. این دستاورد با بررسی های مارتیز و همکارانش در سال ۱۹۹۹ مطابقت داشت (Martinez et al., 1999). نتایج این مطالعه به خوبی نشان داد که همبستگی بالایی بین دو آزمون فلوسایتومتری و روش سنتی شمارش دستی کلونی های زنده وجود دارد ($r=0/89$, $p\leq 0/001$) که با نتایج مطالعه مارتیز و همکارانش در سال ۲۰۰۶ هم‌خوانی داشت. آنها در این بررسی، روش اپسونوفاگوسیتیک چندتایی فلوسایتومتری (multiplex flow cytometry) را به منظور تعیین آنتی‌بادی‌های عملکردی ضدکپسول استرپتوکوک پنومونیه راه‌اندازی کردند. آنها بیان کردند آزمون اپسونوفاگوسیتوز طراحی شده در فرمت جذب به‌طور مستقیم کشته‌شدن باکتری‌های زنده را اندازه‌گیری نمی‌کند، بلکه کلیه فرآیندهایی را که در فاگوزوم منجر به کشتن باکتری می‌شود از جمله اتصال آنتی‌بادی، ثبوت کمپلمان، اتصال سلولی از طریق رسپتورهای کمپلمان، درون خوارگی و در نهایت فعال‌سازی طوفان اپسونین ها را ارزیابی می‌کند

واکسن علیه استرپتوکوک پنومونیه مطرح شده‌اند (Borsa et al., 2019). تا به حال در مطالعات صورت گرفته برای ایجاد پاسخ ایمنی مطلوب در شرایط درون‌تنی، گونه‌های حیوانی از موش کوچک آزمایشگاهی (Saeland et al., 2000)، موش صحرايي (Woudenberg et al., 1979) و خرگوش (Nau et al., 1994) به عنوان مدل آزمایشگاهی به کار گرفته شده‌اند. درست است که مدل‌های آزمایشگاهی با جثه بزرگتر امکان جمع‌آوری نمونه با حجم بیشتری را به محقق می‌دهند ولی از طرفی امکان بکارگیری تعداد کمتری در هر گروه مطالعه باعث عدم اطمینان به داده‌های آماری آن پژوهش می‌گردد. لذا بیشتر مطالعات مدل موش کوچک آزمایشگاهی را به علت اقتصادی بودن، ملاحظات اخلاقی (گونه پست‌تر)، بکارگیری تعداد بیشتر در هر گروه مطالعه و اطمینان بالای محاسبات آماری برگزیده‌اند (Fernsten et al., 2011; Berical et al., 2016). سندر و همکارانش در ۲۰۰۳، آزمون اپسونوفاگوسیتوز را با استفاده از رده سلولی HL60 و لکوسیت‌های خون محیطی روی ۵۵ نمونه سرم واکسینه شده انسان راه‌اندازی کردند. آنها از روش دستی شمارش کلونی زنده باکتریایی به عنوان روش استاندارد یاد کردند (Sandra et al., 1979). جستر و همکاران در سال ۱۹۹۴، همبستگی بین تحریک ماکروفاژها علیه فاگوسیت‌کردن کپسول باکتری (فعالیت اپسونیک) و آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ‌های مختلف را علیه دیواره سلولی کپسول پلی ساکارید بررسی کردند. آنها نشان دادند ارتباط خوبی بین سطوح آنتی‌بادی و فعالیت اپسونیک وجود دارد (Gestur et al., 1994). نتایج این مطالعه مشخص کرد دو شکل اصلی برای آزمون

از برتری مدل موشی BALB/c خبر می‌دهد، چرا که حداقل تیتراپسونوفاگوسیتوز قابل اعتماد را DBA/2، در رقت کمتری از آنتی‌بادی (۱۱/۱۲۸) در مقابل (۱۱/۶۴) رخ داد. به عبارتی دیگر، با رقیق شدن آنتی‌بادی‌های سرم در موش BALB/c، هم چنان امکان فاگوسیتوز بیش از ۵۰ درصد باکتری‌ها وجود دارد. دلیل این برتری می‌تواند به سبب شباهت زیاد مجموعه سازگاری بافتی (MHC Haplotype) موش BALB/c با نوع انسان باشد که در نهایت می‌تواند باعث تاثیر پاسخ‌های مجموعه لنفوسیت T گردد. این نتیجه همسو با مطالعات صورت‌گرفته توسط بورتون و همکاران در رابطه با ایمنی‌زایی واکسن کونزوگه پنوموکوک در مدل موش BALB/c بود (Burton et al., 2006). در این آزمون برای اولین بار از سلول‌های ماکروفاژ موشی به جای سلول‌های ماکروفاژ انسانی استفاده شد که پاسخ اختصاصی بالاتری ایجاد کرد. به دلیل محدودیت در دسترسی به دیگر سویه‌های استرپتوکوک پنومونیه که در واکسن استفاده می‌شود، این مطالعه تنها روی سویه 19F استرپتوکوک پنومونیه صورت گرفت. لذا پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی سویه‌های دیگر استرپتوکوک پنومونیه نیز بررسی گردد. لذا با توجه به اهمیت این عامل در صنعت اسب در دامپزشکی، ساخت واکسن با کارایی بالا باید در اولویت قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی انستیتو پاستور ایران به دلیل تامین هزینه این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

(Martinez et al., 2006). در سال ۲۰۰۶، روبرت و همکاران یک آزمون اپسونوفاگوسیتوز قابل اعتماد را توسعه دادند که در آن بسیاری از متغیرها اندازه‌گیری و بهینه شد. آن‌ها نمونه‌های سرم را از ۱۸ فرد بالغی که واکسن دریافت کرده بودند وارد آزمون اپسونوفاگوسیتوز کردند. سپس با اضافه کردن کمپلمان و رده سلولی HL60 به هر یک از چاهک‌های حاوی سرم فوق، تیتراپسونوفاگوسیتوز را به صورت درصد کشتن ۵۰ درصد از باکتری‌ها مشخص نمودند. در این آزمون از روش فلوسایتومتری چندتایی استفاده شد که بطور همزمان در یک آزمون امکان سنجش آنتی‌بادی علیه چند سروتیپ/استرپتوکوک پنومونیه وجود دارد. نتایج این آزمون نیز با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت داشت (Robert et al., 2006). ایمنی میزبان به پنوموکوک توسط ایمنی ذاتی و اکتسابی شامل آنتی‌بادی‌های اپسونیزه‌کننده، کمپلمان و سلول‌های موثر بیگانه خوار تعدیل می‌گردد. فاگوسیتوز پنوموکوک که توسط آنتی‌بادی‌های عملکردی تحریک می‌شود یک روش ارزیابی کارایی واکسن‌های پنوموکوک است (Feldman and Anderson, 2020). تاکنون هیچ مطالعه معتبر یا مرجعی که به‌طور شفاف و در قالب یک دستورالعمل اطلاعات استخراج‌شده از مطالعات پیش بالینی واکسن کونزوگه پنوموکوک در حیوانات را به اطلاعات بالینی در انسان ارتباط دهد وجود ندارد. از طرفی با توجه به اهمیت این بیماری در انسان و احتمال انتقال آن به اسب، مطالعات برای بررسی ایمنی‌زایی واکسن کونزوگه پنوموکوک در اولویت قرار گرفته است. نتایج این مطالعه علاوه بر طراحی یک روش سنجش ایمنی‌زایی واکسن علیه استرپتوکوک پنومونیه،

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد منافع‌ای ندارند.

منابع

- Berical, A.C., Harris, D., Dela Cruz, C.S. and Possick, J.D. (2016). Pneumococcal Vaccination Strategies an Update and Perspective. *Annals of American Thoracic Society*, 13(6): 933-944.
- Borsa, N., Pasquale, M.D. and Restrepo, M.I. (2019). Animal Models of pneumococcal pneumonia. *International Journal of Molecular Science*, 20(17): 4222.
- Chanter, N. (1997). Streptococci and enterococci as animal pathogens. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 83(S1): 100S-109S.
- Chiavolini, D., Pozzi, G. and Ricci, S. (2008). Animal models of Streptococcus pneumonia Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4): 666-685.
- Converso, T.R., Assoni, L., André, G.O., Darrieux, M. and Leite, L.C.C. (2020). The long search for a serotype independent pneumococcal vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 19(1): 57-70.
- Daniels, C.C., Rogers, P.D. and Shelton, C.M. (2016). Review of pneumococcal vaccines: Current polysaccharide vaccine recommendations and future protein antigens. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 21(1): 27-35.
- Dockrell, H.D., Whyte Moira, M.K.B. and Timothy, J.M. (2012). Pneumococcal pneumonia mechanisms of infection and resolution. *Chest*, 142(2): 482-491.
- Feldman, C. and Anderson R. (2020). Recent advances in the epidemiology and prevention of Streptococcus pneumoniae infections. *F1000 Research*, 7(9): F1000.
- Gestur, V., Ingileif, J., Steinn, J. and Helgi, V. (1994). Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharide of Streptococcus pneumoniae. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(3): 592-599.
- Ginders, M., Leschnik, M., Künzel, F., Kampner, D., Mikula, C., Steindl, G., *et al.* (2017). Characterization of Streptococcus pneumoniae isolates from Austrian companion animals and horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1): 79.
- Jia, P., Dai, S., Wu, T. and Yang, S. (2021). New approaches to anticipate the risk of reverse zoonosis, 36(7): 580-590.
- Martinez, J.E., Clutterbuck, E.A., Li, H., Romero-Steiner, S. and Carlone, G.M. (2006). Evaluation of multiplex flow cytometric opsonophagocytic assays for determination of functional anticapsular antibodies to Streptococcus pneumoniae. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(4): 459-466.
- Martinez, J.E., Romero-Steiner, S., Pilishvili, T., Barnard, S., Schinsky, J., Goldblatt, D., *et al.* (1999). A flowcytometric opsonophagocytic assay for measurement of functional antibodies elicited after vaccination with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(4): 581-586.
- Masomian, M., Ahmad, Z., Gew, L.T. and Poh, C.L. (2020). Development of next generation Streptococcus pneumoniae vaccines conferring broad protection. *Vaccines (Basel)*, 17; 8(1): 132.
- Nau, R., Kaye, K., Sachdeva, M., Sande, E. and Tauber, M.G. (1994). Rifampin for therapy of experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 1186-1189.
- Papadatou, I., Tzovara, I. and Licciardi, P.V. (2019). The role of serotype-specific immunological memory in pneumococcal vaccination: Current knowledge and future prospects. *Vaccines*, 7(1): 13.

- Park, C., Kwon, E.Y., Choi, S.M., Cho, S.Y., Byun, J.H., Park, J.Y., *et al.* (2017). Comparative evaluation of a newly developed 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in a mouse model. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(5): 1169-1176.
- Robert, L.B. and Moon, H.N. (2006). Development and validation of a fourfold multiplexed opsonization assay (MOPA4) for pneumococcal antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(9): 1004-1009.
- Romero-Steiner, S., Frasch, C., Concepcion, N., Goldblatt, D., Kayhty, H., Vakevainen, M., *et al.* (2003). Multilaboratory evaluation of a viability assay for measurement of opsonophagocytic antibodies specific to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(6): 415-422.
- Saeland, E., Vidarsson, G. and Jonsdottir, I. (2000). Pneumococcal pneumonia and bacteremia model in mice for the analysis of protective antibodies. *Microbial Pathogenesis*, 29(2): 81-91.
- Soheyli, Z., Soleimani, M. and Majidzadeh, K. (2017). A PCR Assay for detection of mycoplasma contamination in cell culture by rRNA 16S specific primers. *Paramedical Sciences and Military Health*, 12(2): 13-20. [In Persian]
- Sorensen, R.U. and Edgar, D. (2019). Specific antibody deficiencies in clinical practice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 7(3): 801-808.
- Stern, P.L. (2020). Key steps in vaccine development. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 125(1): 17-27.
- Timoney, J.F. (2004). The pathogenic equine streptococci. *Veterinary Research*, 35(4): 397-409.
- Turner, A.E.B., Gerson, J.E., So, H.Y., Krasznai, D.J., Hilaire, A.J.S. and Gerson, D.F. (2017). Novel polysaccharide-protein conjugates provide an immunogenic 13-valent pneumococcal conjugate vaccine for *S. pneumoniae*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1): 49-58.
- Whatmore, A.M., King, S.J., Doherty, N.C., Sturgeon, D., Chanter, N. and Dowson, C.G. (1999). Molecular characterization of equine isolates of *Streptococcus pneumoniae*: natural disruption of genes encoding the virulence factors pneumolysin and autolysin. *Infection and Immunity*, 67(6): 2776-2782.
- Woudenberg, I.A., Hoenderop, J.Y. and Michel, M.F. (1979). Efficacy of antimicrobial chemotherapy in experimental rat pneumonia: effects of impaired phagocytosis. *Infection and Immunity Journal*, 25(1): 366-375.