فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۱، دوره ۱۶، شماره ۱، زمستان۱۴۰۱، صفحه ۸۴ تا ۱۰۰
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

بررسی ایمنی زایی کونژوگه آلژینات تیپ۶ *استرپتوکوکوس پنومونیه* و توکسوئید دیفتری در مدل موش BALB/C

بهرام صنعتی منفرد[۱]، رضا شاپوری[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.
۲-استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. نویسنده مسئول: rezashapoury@yahoo.com

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۶/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوکوس پنومونیه یکی از باکتری‌های پاتوژن عفونی در انسان می‌باشد. عامل بیماریهای پنومونی محسوب می شود. در دستگاه تنفسی افراد مستعد مانند بیماران دچار نقص ایمنی و ایدز کلونیزه شده و عفونت‌های مزمن و مقاوم به درمان ایجاد می‌کند. هدف مطالعه حاضر، تهیه واکسنی با ترکیب آنتی‌ژنی کونژوگه و با قابلیت القاء آنتی‌بادی و ایمنی خاطره‌ای به‌صورت تجربی بر روی تیپ ۶ استرپتوکوکوس پنومونیه در مدل موش BALB/C است.

مواد و روش ها: سویه استرپتوکوکوس پنومونیه تیپ ۶ در مولر هینتون آگار کشت شده و در انتهای فاز لگاریتمی رشد، توسط NaOH یک نرمال استخراج و تغلیظ گردید. کپسول پلی‌ساکاریدی با استفاده از (ADH) آدیپک اسید دی هیدرازید و EDAC به توکسوئید دیفتری متصل شد. پس از کروماتوگرافی با مخلوط کردن کونژوگه (CPS-DT) کپسول پلی‌ساکاریدی با توکسوئید دیفتری و محلول آلژینات آنتی‌ژن موردنظر آماده گردید. آنتی‌ژن‌های آماده شده به ۴ گروه ۱۵ تایی از موش‌ها به‌صورت داخل صفاقی با فواصل دوهفته‌ای تزریق شد. در نمونه‌های سرمی پاسخ‌های آنتی‌بادی به‌روش الایزا اندازه‌گیری شد.

نتایج: طبق نتایج الایزا تیتر IgG تام از ۳۱۵ به ۱۶۸۰ رسید. تیتر IgM و IgA به ترتیب از ۹۰ به ۶۱۰ و ۱۸ به ۲۸ افزایش یافت. آنتی‌بادی‌های سرمی گروه واکسینه‌شده باآلژینات توکسوئید دیفتری پس از هر بار تزریق افزایش معنی‌داری از لحاظ آماری داشت. تیتر IgG تام، IgM و IgA تولید شده علیه آلژینات در گروه‌های واکسینه با کونژوگه نسبت به آلژینات خاص افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: میکروپارتیکل آلژیناتی کپسول پلی‌ساکاریدی استرپتوکوکوس پنومونیه در فرم کونژوگه با توکسوئید دیفتری موجب افزایش آنتی‌بادی‌ها می‌شود. افزایش تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های واکسینه احتمالا موجب فعال شدن سلول‌های T و ایجاد خاطره ایمنی شود. بنابراین کونژوگه آلژینات و توکسوئید دیفتری می‌تواند کاندید مناسبی به‌منظور تهیه واکسن باشد.

کلمات کلیدی: *استرپتوکوکوس پنومونیه*، توکسوئید دیفتری، کونژوگاسیون، کپسول پلی‌ساکاریدی تیپ VI، میکروپارتیکل آلژیناتی.

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه از عوامل مهم بیماری و مرگ ومیر در تمام سنین است و باعث اشکال مختلف بیماری شامل اوتیت میانی، پنومونی، سپتی‌سمی و منتژیت می‌شود. این میکروب غالباً در دستگاه تنفسی فوقانی کلونیزه شده و شایعترین علت پنومونی باکتریال از (CAP) اجتماع حاصل از پنومونی می‌باشد (۱-۳). تشخیص قطعی عفونت پنوموکوکی با جدا کردن ارگانیسم *استرپتوکوک پنومونیه* از کشت نمونه بالینی بیمار بخصوص کشت خون است (۴،۵). تعداد قابل توجهی از کودکان مبتلا به پنومونی باکتریال کشت خون منفی دارند. به‌علت نداشتن استاندارد طلایی تشخیص ودرمان پنومونی باکتریال کودکان اغلب براساس تشخیص احتمالی و بر اساس مجموعه علایم بالینی و رادیولوژیک و پاراکلینیک در کودکان و احتمالی است (۳). مشکلات عدیده‌ای مانند عدم استفاده از روش-های کشت پیشرفته و استاندارد برای کشت‌های باکتریال در کشور وجود دارد که منجر به موارد بالای کشت-های منفی خون و کشت از سایر نواحی استریل در بدن در مقایسه با کشورهای توسعه یافته می‌شود (۶،۷). در نتیجه بسیاری از کودکان نه تنها در کشور ما بلکه در سایر نواحی دنیا به‌طور چشم بسته با عنوان کلی پنومونی باکتریال با انواع آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شوند . استفاده نابه‌جا و چشم بسته از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از عوامل افزایش مقاومت میکروب‌ها بویژه پنوموکوک‌ها در کشور است، علی‌رغم وجود واکسن مناسب که می‌تواند در پیشگیری از عفونت پنوموکوکی به‌کار رود (۸،۹،۱۰،۱۱).

استرپتوکوکوس پنومونیه ارگانیسم دیپلوکوک گرم مثبت با آرایش‌های دوتایی و یا زنجیره‌ای است که یکی از مهم‌ترین باکتری‌های پاتوژن در انسان می‌باشد. پنومونی یک بیماری عفونی است که یکی از عوامل ایجادکننده آن باکتری‌های خانواده استرپتوکوکاسیه می‌باشد. پنومونی پنوموکوکی شایع ترین پنومونی باکتریال است. در ایالات متحده، میزان تخمینی موارد آن در حدود ۶۸ تا ۲۶۰ مورد در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر جمعیت و یا در حدود ۱۵۰/۰۰۰ تا ۳۰۰/۰۰۰ مورد ابتلاء در هر سال است (۱). در سنین بالاتر از ۴۰ سالگی شیوع آن در حدود ۳ تا ۴ برابر بیشتر است. شیوع بالایی از ابتلاء به بیماری معمولاً در ماه‌های زمستان وجود دارد. در این موارد عفونت‌های مکرر ویروسی زمینه‌ساز ابتلاء به عفونت‌های ثانویه باکتریال هستند و شیوع ابتلاء به عفونت پنوموکوکی و انتشار ارگانیسم بیشتر است (۲،۳). درمان با آنتی‌بیوتیک غالباً پاسخ کلاسیک آماسی را متوقف نموده و یا این که تغییر می‌دهد. بنابراین ضایعات منتشر پنومونی ناپدید می‌شوند. پنی‌سیلین، آنتی‌بیوتیک انتخابی برای تمام اشکال عفونت پنوموکوکی است. پنی‌سیلین G از راه داخل عضلاتی، آنتی‌بیوتیک انتخابی در درمان پنوموکوکی به-ویژه در مواردی است که عوارض جانبی نداشته باشد. در بیماران سرپایی که مبتلا به فرم‌های خفیف پنومونی پنوموکوکی هستند. پنی‌سیلین V خوراکی نیز ممکن‌است مؤثر باشد اما جذب آن از دستگاه گوارش به‌ویژه در مبتلایان به فرم-های حاد بیماری غیرقابل پیش‌بینی است. برای بیمارانی که در شوک هستند و یا این‌که در کنار پنومونی، مبتلا به منتژیت، اندوکاردیت و یا آرتریت می‌باشند پنی‌سیلین کریستالی در شکل وریدی تجویز می‌شود. در بیمارانی که نسبت به پنی‌سیلین آلرژی دارند از سفالوسپورین یا اریترومایسین برای پنومونی و از کلرامفنیکل برای منتژیت استفاده می‌شود. در هنگام درمان با پنی‌سیلین پاسخ جالبی وجود دارد به این ترتیب که اگر باکتریمی وجود داشته‌باشد در مدت چند ساعت بهبود می-

یابد(۱۲-۱۵). پنومونی پنوموکوکی تنها در هنگامی که سدهای دفاعی سیستم تنفسی تخریب شده‌باشند ایجاد می‌گردد و در شکل عفونت اولیه، نادر است. سرما، بی‌هوشی، مرفین و مسمومیت با الکل موجب بروز استعداد ابتلاء به پنومونی پنوموکوکی می‌شوند(۴). در چند دهه اخیر واکسن‌های کونژوگه متعددی جهت القاء حفاظت علیه پاتوژن‌های حامل بخش پلی‌ساکاریدی طراحی شده‌اند (۵). در این پژوهش از روش آمیداسیون که یکی از پایدارترین نوع مولکول‌های کونژوگه را ایجاد می‌کند برای کونژوگاسیون استفاده شد و از ADH به‌عنوان مولکول فاصله‌گذار و EDAC به‌عنوان عامل جفت‌کننده استفاده شد. ADH که یک مولکول نوکلئوفیل می‌باشد به‌صورت کووالان بر گروه‌های آمینی مولکول CPS متصل می‌شود. EDAC نیز سبب اتصال کووالان (AH-CPS) آدیپیک هیدرازید–پلی‌ساکارید به حامل پروتئینی از طریق پیوند آمیدی بین AH-CPS با گروه‌های کربوکسیل پروتئین می‌شود (۵).

هدف از پژوهش حاضر این است که با کونژوگه کردن توکسوئید دیفتری به‌عنوان یک بخش پروتئینی به دتوکسیفای *استرپتوکوکوس پنومونیه* تیپ ۶ حاوی آلژینات به‌عنوان بخش پلی‌ساکاریدی، با روش آمیداسیون، واکسنی تولید کرده که پتانسیل بالایی برای حفاظت طولانی و پایدار در هر دو گروه بزرگسال و خردسال داشته باشد و سبب فعال شدن لنفوسیت‌های T (T-helper) و ایجاد سلول‌های خاطره‌ای شده که به‌موجب آن حفاظت پایدار و طولانی در برابر عفونت‌های پنوموکوکی ایجاد گردد. دلیل انتخاب توکسوئید دیفتری و کونژوگه آن با پلی‌ساکارید *استرپتوکوکوس پنومونیه* حاوی آلژینات تهیه یک ترکیب ایمونوژن کارا علیه بیماری‌های پنوموکوکی، استفاده از خواص پروتئینی توکسوئید دیفتری به‌عنوان پروتئین حامل برای مولکول پلی‌ساکاریدی و استفاده از خواص ادجوانتی *استرپتوکوکوس پنومونیه* حاوی آلژینات برای القاء ایمنی بیشتر نسبت به توکسوئید دیفتری می‌باشد تا در صورت اثبات کارایی این ترکیب کونژوگه علیه بیماری‌های پنوموکوکی بتوان این کونژوگه را به‌عنوان یک واکسن کاندید برای بیماری پنومونی معرفی کرد(۱). بر همین اساس اهداف این پژوهش عبارتند از: تهیه میکروپارتیکل آلژیناتی کونژوگه *استرپتوکوکوس پنومونیه* با توکسوئید دیفتری و بررسی اثرات ایمنی‌زایی کونژوگه *استرپتوکوکوس پنومونیه* تیپ ۶ با توکسوئید دیفتری در القاء تولید آنتی‌بادی‌های total IgG، IgG_1، IgG_2a، IgG_2b، IgG_3، IgM، IgA علیه پنوموکوک.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت *استرپتوکوکوس پنومونیه* تیپ VI

از *سویه استرپتوکوکوس پنومونیه* بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار که با توجه به دستور آماده‌سازی محیط کشت که بر روی لیبل محیط کشت توسط کارخانه تعبیه شده بود تحت شرایط استریل و زیر هود لامینار و در کنار شعله توسط آنس استریل شده با لوپ سوزنی کشت خطی انجام داده شد و بعد داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ روز قرار داده‌شد. سپس کلنی‌های تشکیل شده با سل اسکراپر استریل جمع‌آوری گردید و جهت کشت انبوه در محیط نوترینت براث (که به تعداد چهار محیط ۵۰۰ میلی‌لیتر که با نسبت ۸ گرم در لیتر تهیه و اتوکلاو شده‌بود) کشت داده‌شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیکردار به‌مدت ۳ روز انکوبه‌گذاری گردید. نگه‌داری سویه باکتری موردنظر در طول مراحل بعدی تحقیق ضروری‌است. به‌این منظور از محیط کشت مولرهینتون آگار

استفاده شد. برای پاساژ باکتری، در دمای آزمایشگاه در کنار شعله و تحت شرایط استریل، با استفاده از فیلدوپلاتین استریل از کلنی‌های باکتری موجود در محیط کشت مولرهینتون آگار برداشته‌شد و بعد از پاساژ به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌گذاری گردید.

استخراج CPS

پس از رشد *استرپتوکوکوس پنومونیه* در محیط کشت نوترینت براث، داخل هر ارلن ۵۰۰ میلی لیتر، ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ٪۹۰ ریخته و بیومس حاصل درون لوله‌های سانتریفیوژ توزیع و به‌صورت بالانس درون باکس‌های دستگاه قرار داده‌شد. هر کدام از لوله‌ها به کمک فویل و نوار پارافیلم بسته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰۰rpm به‌مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت که مایع شفافی بود را دور ریخته و رسوب به‌دست آمده که همان باکتری‌ها بودند برای استخراج CPS نگه‌داری شد. در نهایت رسوب‌های موجود، در یک لوله جمع‌آوری گردید (۹).همه رسوب‌های مرحله قبل که وزن آن حدود ۳/۴ گرم می‌باشد را جمع کرده و به اندازه ۴ برابر حجم رسوب نهایی NaOH یک نرمال به آن افزوده و به‌هم زده‌شد تا کاملاً مخلوط شده و محلولی شفاف به‌دست آید. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انکوبه‌گذاری گردید. لوله‌های حاوی رسوب و NaOH به‌مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۲۵۰۰ rpm برای رسوب دبریس‌ها سانتریفیوژ شد (۱۰). سوپرناتانت حاصل از مرحله قبل، با HCl ده نرمال خنثی‌سازی شد. سپس سه برابر حجم سوپرناتانت، اتانل سرد اضافه شد و به‌مدت یک شبانه‌روز در یخچال نگهداری شد. سپس با تکرار سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰rpm رسوب حاصل از این مرحله که حاوی کپسول پلی‌ساکاریدی است جمع‌آوری شد. به رسوب به‌دست آمده بافر تریس ۰/۱ مولاری که pH آن حدود ۷/۵ تنظیم شده به‌صورت ۵ میلی‌لیتر، ۵ میلی‌لیتر اضافه کرده تا رسوب به‌طور کامل شفاف شود که در نهایت رسوب CPS با حدود ۴۰ میلی‌لیتر بافر تریس شفاف شد. سپس ۰/۵٪ (SDS) سدیم دودسیل سولفات و ۱۰ میلی‌مولار $CaCL_2$ در حجم ۴۰ میلی‌لیتر بافر محاسبه و به محلول فوق اضافه شد (۱۰).

دپلیمریزاسیون کپسول پلی‌ساکاریدی جهت آماده‌سازی برای مراحل کونژوگاسیون

ابتدا ۳۰ میلی‌گرم CPS در حدود ۳ میلی لیتر N NaOH۰/۵ حل شد میزان NaOH باید در حدی باشد که رسوب حاوی CPS به‌طور کامل شفاف شود. لوله سانتریفیوژ حاوی رسوب CPS حل شده در NaOH به‌مدت یک ساعت داخل بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از گذشت یک ساعت سریعاً لوله در دمای اتاق وارد یک بشر حاوی یخ شد تا شوک دمایی به CPS داده شود. سپس محلول در این حالت به مدت ده دقیقه نگهداری شد. به ازای هر میلی‌لیتر NaOH مورد استفاده در حل شدن CPS، ۱۲۵ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال به نمونه اضافه شد. البته به‌حدی اضافه می‌شود که pH روی ۴ تنظیم شود در نتیجه به‌تدریج CPS-N داستیله می‌شود. به ازای هر میلی‌لیتر NaOH مورد استفاده در حل شدن CPS، ۲۰۰ میکرولیتر $NaNO_2$ با ۵٪ وزنی-حجمی اضافه و نمونه به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شد. در نهایت با طی شدن مراحل فوق کپسول پلی‌ساکاریدی دپلیمریزه و برای کونژوگاسیون آماده شد (۱۱).

کونژوگاسیون کپسول پلی‌ساکاریدی تیپ VI *استرپتوکوکوس پنومونیه* با توکسوئید دیفتری

کونژوگاسیون پلی‌ساکارید استخراج شده از CPS به توکسوئید دیفتری به‌روش آمیداسیون انجام گرفت. در روش آمیداسیون، سیانوژن بروماید به‌عنوان عامل ایجادکننده

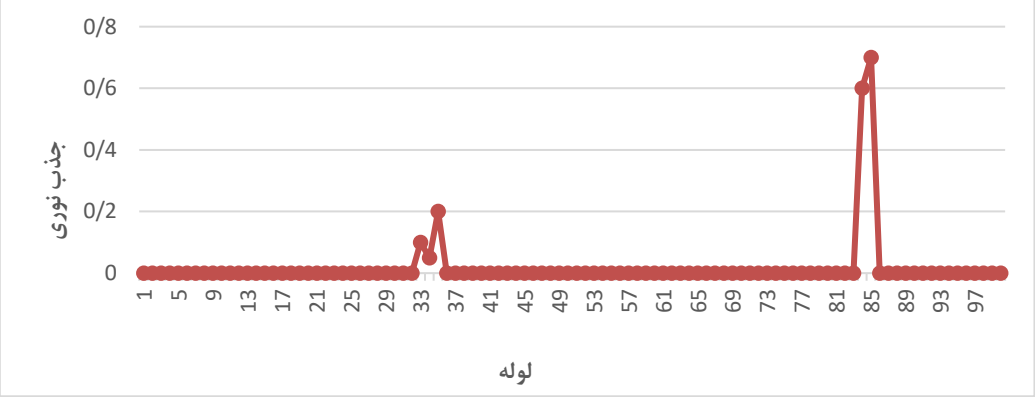
گروه‌های آمینی در مولکول پلی‌ساکاریدی، ADH به‌عنوان یک مولکول فاصله‌گذار (spacer) ۶ کربنه و EDAC در نقش عامل جفت‌کننده استفاده می‌شود. ADH به صورت کوالان به گروه‌های آمینی مولکول الیگوپلی‌ساکارید متصل می‌شود. EDAC نیز در این مرحله سبب اتصال کوالان مشتق آدیپیک هیدرازید- الیگوپلی‌ساکارید به حامل پروتئینی به‌صورت پیوند آمیدی بین هیدرازید پلی‌ساکارید با گروه‌های کربوکسیل توکسوئید دیفتری متصل می‌شود (۱۰، ۹، ۵).

ژل فیلتراسیون به‌منظور تخلیص مولکول‌های کونژوگه

برای خالص‌سازی مولکول‌های کونژوگه CPS-DT از مولکول‌های غیرکونژوگه (CPS,DT) نمونه کونژوگه تهیه شده از ستون کروماتوگرافی سفارُز CL-4B که با محلول کلرید سدیم ۰/۲ مولار به تعادل می‌رسد عبور داده شد تا از پلی‌ساکارید و پروتئین متصل نشده جدا و خالص گردد. فرکشن‌های جمع آوری شده در دو طول موج ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد و لوله‌هایی که بیشترین جذب در هر دو طول را موج داشتند به‌عنوان فرکشن‌های حاوی مولکول کونژوگه جمع‌آوری و با هم ادغام شدند. سپس کونژوگه‌های تهیه شده با کمک اولتراسانتریفیوژ، تغلیظ و از فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس مرتیولات با غلظت نهایی ۱ در ۱۰۰۰ اضافه گردید (۱۰، ۹، ۵).

تهیه میکروپارتیکل‌های کونژوگه CPS-DT حاوی آلژینات

میکروپارتیکل‌های آلژینات به‌روش امولسیونه کردن در فاز آلی ایزواکتان تهیه گردید. ابتدا محلول‌های آلژینات با غلظت های مختلف تهیه شدند. ۱۰ میلی‌لیتر که حاوی کونژوگه و آب مقطر بود را جدا کرده سپس ۴ گرم پودر کلرید کلسیم ۸٪ به‌عنوان عامل کراس‌لینک‌کننده به امولسیون در حال هموژن شدن، به‌صورت قطره قطره اضافه شد و به‌مدت ۳ دقیقه ادامه یافت. سپس ۰/۲ گرم آلژینات سدیم و ۲ میلی‌لیتر ایزواکتان اضافه شد و به‌مدت ۳ الی ۶ دقیقه امولسیونه گردید. سپس محلول آبی Tween80 به‌مقدار ۷۵۰ لاندا اضافه شد و پس از امولسیونه کردن، مجدداً کلرید کلسیم ۸٪ اضافه گردید. سپس در زیر میکروسکوپ نوری از میکروپارتیکل‌ها عکس‌برداری گردید. برای تهیه میکروپارتیکل‌های حاوی آنتی‌ژن پنوموکوک، قبل از شروع تهیه میکروپارتیکل آلژینات، باید آنتی‌ژن با غلظت‌های مورد بررسی با محلول آلژینات مخلوط گردید (۵).



شکل ۱: میزان جذب نوری فرکشن‌های حاصل از ستون کروماتوگرافی

پس از بررسی میکروپارتیکل‌ها با غلظت‌های مختلف پلیمر و محلول‌های فاز آلی و آبی، در شرایط بهینه به‌دست آمد و بهترین غلظت مواد تشکیل‌دهنده میکروپارتیکل مشخص گردید. برای تهیه میکروپارتیکل‌های آلژینات حاوی آنتی‌ژن پنوموکوک به محلول آلژینات اضافه شد. سپس هر یک از این محلول‌ها به ایزواکتان حاوی Spam 80 افزوده شدند و توسط هموژنایزر هموژن گردیدند و پس از افزودن Tween 80 و

ایمن‌سازی با آنتی‌ژن‌های تهیه شده

برای بررسی ایمنی‌زائی تزریق کونژوگه تهیه شده، پلی-ساکارید خالص، توکسوئید دیفتری خالص و NS هرکدام به موش‌های BALB/c ماده (۶-۵ هفته‌ای) و (۸-۷ هفته‌ای) به-صورت داخل صفاقی (I.P) با حجم نهایی ۰/۵ میلی‌لیتر انجام شد، به‌طوری که در هر دُز تزریق به‌ترتیب ۲/۵ میکروگرم CPSو یا CPS-DT و LF6 ازDT وجود داشته باشد. به گروه‌های کنترل نیز به همان مقدار سرم فیزیولوژی استریل تزریق گردید. ۴ گروه هر کدام شامل (۹و۹و۶و۳) موش، برای تعیین ایمنی‌زائی به این ترتیب جهت تزریق لیبل‌بندی می‌شوند: CPS-DT، CPS، DT و NS. سه بار تزریق در فاصله دو هفته صورت می‌گیرد، خون‌گیری از قلب موش دو هفته بعد از هر تزریق انجام و سرم جمع‌آوری شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا مرحله بعدی نگهداری شد. تیتر آنتی‌بادی‌های ویژه پلی‌ساکارید به‌وسیله تست الایزا مشخص شد (۱۰).

بررسی پاسخ آنتی‌بادی‌های سرمی به میکروپارتیکل‌های حاوی کونژوگه (CPS-DT)

در این مطالعه تیتر آنتی‌بادی‌های سرمی IgG_{2a}، IgG_1، IgG_{2b}، IgG_3، و IgG تام ایجاد شده علیه پلی‌ساکارید با استفاده از روش Elisa اندازه‌گیری گردید (۵). در آزمایش کلرید کلسیم ۸٪ طبق روش ذکر شده، میکروپارتیکل‌ها با ۲ بار سانتریفوژ جمع‌آوری و با آب‌مقطر شسته شدند. میکروپارتیکل‌ها پس از لیوفیلیزه کردن از نظر کارآیی و ظرفیت احتباس موردارزیابی قرار گرفتند و توسط دستگاه میکروپارتیکل سایز آنالایزر مورد بررسی قرار گرفت و نموداری حاصل گردید (۵).

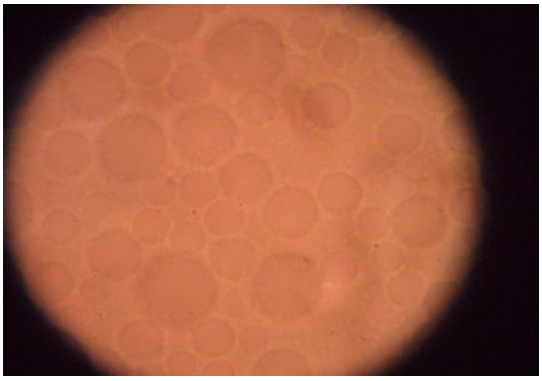
الایزا برای تعیین تیتر آنتی‌بادی‌های IgM و IgA از روش Antigen Mediated Elisa و برای تعیین تیتر آنتی-بادی IgG تام از روش Indirect Elisa استفاده شد. آزمون الایزا به‌روش تری پلیکیت انجام شد.

با انجام تست الایزا به‌صورت سه بار تکرار، تیتر سرمی مربوط به هر کدام از آنتی‌بادی‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار ارائه شد. بر این اساس از آزمون آماری Tukey برای بررسی اختلاف تیترهای سرمی گروه‌های دریافت‌کننده آنتی‌ژن‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA در EXCEL و محیط SPSS استفاده شد و با استفاده از آزمون آماری LSD و $P<0.01$ بررسی گردید.

برای تخلیص کونژوگه، آن را از ستون سفارُز CL-4B به‌روش ژل فیلتراسیون عبور داده و جذب نوری فرکشن‌ها در دو طول موج ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر برای کونژوگه قرائت شد. اگر ملکول‌ها کونژوگه شده باشند باید در دو طول موج ۲۸۰ و ۲۱۰ نانومتر در نمودار پیک مشترکی داشته باشند. پیک اول مربوط به DT-DT است چرا که پروتئین‌ها سنگین‌تر بوده و سریع‌تر از ستون خارج می‌شوند. در پیک دوم هر دو جذب نوری که حاوی محلول کونژوگه مورد نظر ما یعنی پروتئین- پلی‌ساکارید

(Micro-DT) می‌باشند. پیک‌های بعدی به‌ترتیب مربوط به پروتئین، پلی‌ساکارید-پلی‌ساکارید، و پلی‌ساکارید غیرکونژوگه می‌باشند. فرکشن‌های شماره ۸۴ تا ۸۵ جمع‌آوری و تست‌های کنترل کیفی برای تأیید واکسیناسیون انجام شد.

بعد از انجام کونژوگاسیون بررسی میکروسکوپی میکروپارتیکل‌ها زیر میکروسکوپ نوری صورت گرفت(شکل ۲).

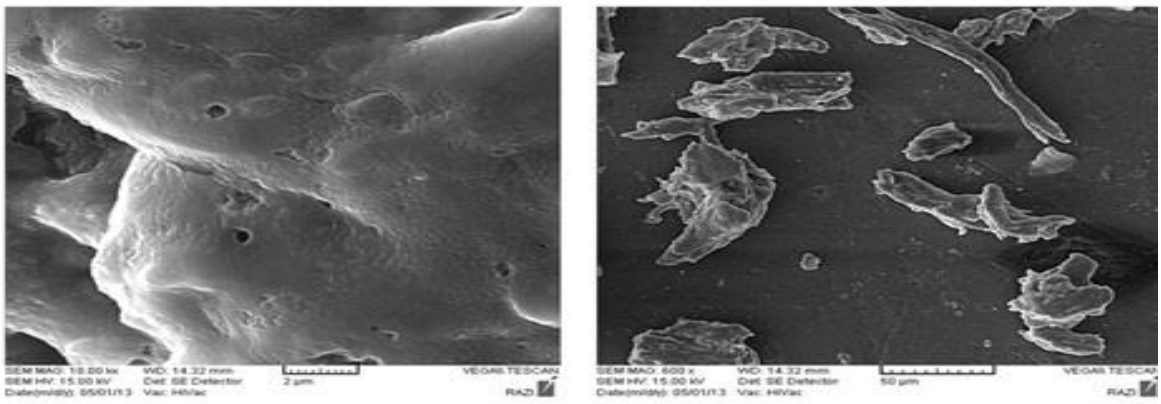


شکل ۲: تصویر برداشته شده از میکروپارتیکل‌ها توسط میکروسکوپ نوری

به وسیله دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر انجام گردید و نتیجه حاصل دو نمودار بود که بر طبق نتایج به‌دست آمده سایز میکروپارتیکل‌ها ۸۶/۵۰ میکرومتر گزارش گردید(شکل ۳).

در آنتی‌بادی IgA دو هفته بعد از اولین تزریق میزان تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های واکسینه با کونژوگه آنتی‌ژن DT و میکروپارتیکل آلژیناتی CPS-DT، افزایش نشان می‌دهد.

هر چند این افزایش زیاد نیست ولی با توجه به نتایج آماری حاصل از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه Tukey با $P<0/01$ تیتر آنتی‌بادی IgA در گروه واکسینه‌شده با محلول میکروپارتیکل آلژیناتی CPS-DT، دو هفته بعد از تزریق‌های اول، دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف را نشان می‌دهد (جدول ۱).



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از میکروپارتیکل‌های آلژینات تهیه شده به‌روش Emulsification با استفاده از ایزواکتان

آنتی‌بادی IgA دو هفته بعد از اولین تزریق میزان تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های واکسینه با کونژوگه آنتی‌ژن DT و میکروپارتیکل آلژیناتی CPS-DT، افزایش نشان داد. هر چند این افزایش زیاد نیست ولی با توجه به نتایج آماری حاصل از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه Tukey با P<0/01 تیتر آنتی‌بادی IgA در گروه واکسینه‌شده با محلول میکروپارتیکل آلژیناتی CPS-DT، دو هفته بعد از تزریق‌های اول، دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف داشت (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه تیترهای آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه CPS VI ۲ هفته بعد از تزریق‌های اول، دوم و سوم

			Micro	CPS	DT	Neg.control
Titer of sera (OD unit) (mean)	دو هفته بعد از اولین تزریق	IgA	۱۸	۱۳	۰	۰
		IgM	۹۰	۶۰	۰	۰
		IgG	۳۱۵	۷۱	۰	۰
		IgG_1	۱۷۰	۴۶	۰	۰
		IgG2a	۲۱	۱۲	۰	۰
		IgG_2b	۱۲	۱۰	۰	۰
		IgG3	۱۴۰	۵۷	۰	۰
	دو هفته بعد از دومین تزریق	IgA	۲۱	۱۶	۰	۰
		IgM	۱۸۲	۱۳۱	۰	۰
		IgG	۱۱۸۰	۲۴۲	۰	۰
		IgG_1	۴۹۰	۸۳	۰	۰
		IgG2a	۳۶	۱۴	۰	۰
		IgG_2b	۳۹	۱۷	۰	۰
		IgG3	۳۹۰	۸۲	۰	۰
	دو هفته بعد از سومین تزریق	IgA	۲۸	۲۰	۰	۰
		IgM	۶۱۰	۱۶۳	۰	۰
		IgG	۱۶۸۰	۲۷۰	۰	۰
		IgG_1	۷۵۰	۱۱۲	۰	۰
		IgG2a	۵۲	۲۸	۰	۰
		IgG_2b	۶۶	۲۰	۰	۰
		IgG3	۷۱۰	۸۹	۰	۰

نتایج

آنتی‌بادی IgM بر علیه CPS و میکروپارتیکل آلژیناتی CPS-DT، طبق جدول۱ افزایش تیتر آنتی‌بادی داشت که در مورد گروه واکسینه‌شده با محلول میکروپارتیکل، در تزریق سوم نسبت به اول این میزان از ۹۰ به ۶۱۰ افزایش یافته بود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدول Tukey با P<0/01 تیتر تمامی آنتی‌ژن‌های تزریق شده در گروه‌های واکسینه‌شده با محلول میکروپارتیکل و گروه واکسینه‌شده با آنتی‌ژن CPS پلی‌ساکارید، دو هفته بعد از تزریق‌های اول،

دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱).

تیتر آنتی‌بادی IgG بر علیه پلی‌ساکارید CPS طی سه دوره تزریق، افزایش نسبی را نشان داد اما در گروه‌هایی که با میکروپارتیکل آلژیناتی CPS-DT واکسینه شده بودند تیتر آنتی‌بادی سرم در تزریق اول تا تزریق سوم از ۳۱۵ به ۱۶۸۰ افزایش یافته‌است. با توجه به نتایج به‌دست آمده در جدول LSD با $P<0.01$ تیتر تمامی آنتی‌ژن‌های تزریق شده در گروه‌های واکسینه‌شده با محلول میکروپارتیکل و گروه واکسینه‌شده با پلی‌ساکارید، دو هفته بعد از تزریق‌های اول، دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱).

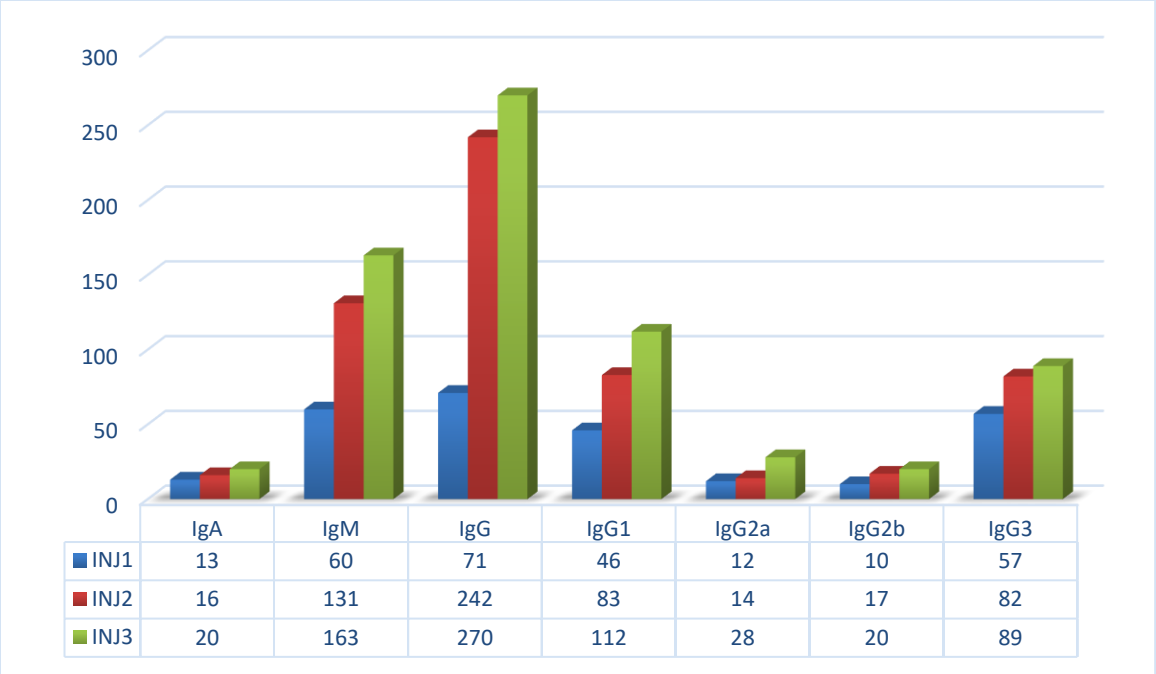
در خصوص IgG_1 بررسی تیترهای به‌دست آمده در تزریق سوم نسبت به اول از ۱۷۰ به ۷۵۰ افزایش نشان‌داده است. با توجه به نتایج Tukey با $P<0/01$ تیتر تمامی آنتی‌ژن‌های تزریق شده در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱).

تیتر آنتی‌بادی IgG2a بر علیه میکروپارتیکل افزایش زیادی نداشته ولی پس از تزریق دوم و سوم در گروه‌های واکسینه‌شده با محلول کونژوگه، این میزان در تزریق سوم نسبت به اول از ۲۱ به ۵۲ رسیده‌است. با توجه به نتایج Tukey با $P<0/01$ تیتر این آنتی‌بادی دو هفته بعد از تزریق‌های اول، دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری است.

میزان تیتر آنتی‌بادی سرمی IgG2b در گروه واکسینه‌شده با محلول میکروپارتیکل کونژوگه آلژیناتی پلی‌ساکارید کپسول *استرپتوکوکوس پنومونیه* با توکسوئید دیفتری، طی سه دُز از ۱۲ به ۶۶ رسیده‌است. با توجه به نتایج به‌دست آمده Tukey با $P<0/01$ اختلاف تیتر آنتی‌بادی IgG2b در دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱).

میزان تیتر آنتی‌بادی سرمی IgG3 در گروه واکسینه شده با محلول میکروپارتیکل، طی سه دُز از ۱۴۰ به ۷۱۰ رسیده‌است. با توجه به نتایج به‌دست آمده Tukey با $P<0/01$ اختلاف تیتر آنتی‌بادی IgG2b در دو گروه اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱).

مقایسه تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های تولید شده پس از تزریق اول نشانگر این است که میزان تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های IgG، IgG1، IgG3، IgM علیه میکروپارتیکل آلژیناتی اختلاف چشم‌گیری نسبت به تیتر سرمی علیه پلی‌ساکارید کپسولی پنوموکوک دارد و پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط IgG علیه میکروپارتیکل آلژیناتی کونژوگه پنوموکوک با توکسویید دیفتری مؤثرتر از سایر آنتی‌بادی‌ها می‌باشد. مقایسه تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های تولید شده پس از تزریق دوم نشانگر این است که میزان تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های IgG، IgG1، IgG3، IgM علیه میکروپارتیکل آلژیناتی به‌میزان چشم‌گیری نسبت به تیتر سرمی پس از تزریق اول افزایش یافته و پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط IgG علیه میکروپارتیکل آلژیناتی کونژوگه پنوموکوک با توکسوئید دیفتری مؤثرتر از سایر آنتی بادی‌ها می‌باشد. مقایسه تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های تولید شده پس از تزریق سوم نشانگر این است‌که میزان تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های IgG، IgG1، IgG3، IgM علیه میکروپارتیکل آلژیناتی به‌میزان چشم‌گیری نسبت به تیتر سرمی پس از تزریق دوم افزایش یافته و پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط آنتی‌بادی‌های فوق علیه میکروپارتیکل آلژیناتی کونژوگه پنوموکوک با توکسوئید دیفتری نسبت به پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه پلی‌ساکارید کپسولی اختلاف معنی‌داری دارد (شکل ۴).



	IgA	IgM	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
INJ1	13	60	71	46	12	10	57
INJ2	16	131	242	83	14	17	82
INJ3	20	163	270	112	28	20	89

شکل٤: نمودار مقایسه تیتر آنتی‌بادی در ۳ نوبت تزریق کونژوگه کپسول پنوموکوک و توکسوئید دیفتری

نمودار شکل ۴ نمایانگر این است که در دوره های سه‌گانه تزریق بیشترین افزایش تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه پلی‌ساکارید کپسولی پنوموکوک به ترتیب در آنتی‌بادی‌های IgG3،IgG1،IgM،IgG می‌باشد.

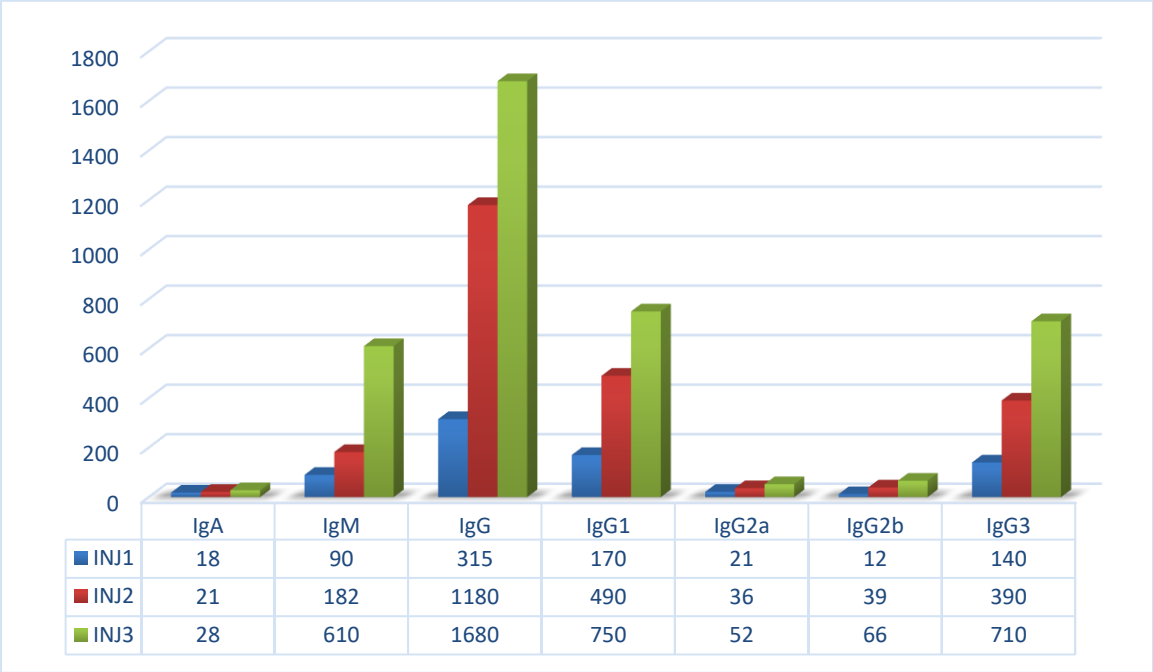
نمودار شکل ۵ نمایانگر این است که در دوره‌های سه‌گانه تزریق بیشترین افزایش تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه پلی‌ساکارید کپسولی پنوموکوک به‌ترتیب در آنتی‌بادی‌های IgG، IgG1، IgG3، IgM می‌باشد.

در تحقیق حاضر نیز علاوه بر استفاده از ADH به‌عنوان مولکول فاصله‌گذار ۶ کربنه، از EDAC به‌عنوان عامل جفت-کننده و کونژوگاسیون بهتر استفاده شد که موجب افزایش پایداری و ایمنی‌زایی مولکول کونژوگه به‌واسطه سالم ماندن هر چه بهتر سایت‌های ایمنی‌زای مولکول‌های آنتی‌ژن گردید. همچنین از توکسوئید دیفتری به‌جای توکسین A به‌عنوان پروتئین حامل استفاده شد. از دُز تزریقی ۰/۵ میکروگرم با ۳ بار تزریق در موش BALB/c با فاصله زمانی ۱۴روز استفاده گردید که با افزایش معنی‌داری در تیتر آنتی‌بادی‌های تولیدی بر علیه میکروپارتیکل آلژیناتی الیگوپلی‌ساکارید در حالت کونژوگه نسبت به الیگوپلی‌ساکارید خالص همراه بود. میزان تیتر IgG توتال و زیرگروه‌های تولید شده آن، علیه Micro OPS - DT در حالت کونژوگه نسبت به OPS خالص در سه تزریق افزایش چشمگیری نشان دادند.

بحث

طبق نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان گفت کونژوگاسیون توکسوئید دیفتری به‌عنوان یک حامل پروتئینی با میکروپارتیکل آلژیناتی پلی‌ساکارید *استرپتوکوکوس پنومونیه* تیپ ۶ از طریق روش آمیداسیون واکسنی تولید کرده‌است که پتانسیل بالایی برای حفاظت طولانی و پایدار نسبت به CPS خالص داشته و سبب فعال شدن لنفوسیت‌های T (T-helper)

می‌گردد و با تحریک سلول‌های T خاطره‌ای ایمنی ایجاد می‌کند. در ضمن میکروپارتیکل تهیه شده اپی‌توپ‌های پایداری را ایجاد کرده که با به دام انداختن کونژوگه آنتی‌ژن-CPS DTرا به‌نحو بهتری به سیستم ایمنی بدن عرضه می‌نماید و نیز تیتر آنتی‌بادی‌های ترشح شده بر علیه Micro CPS-DT تیتر آنتی‌بادی را به‌میزان چشمگیری افزایش داده که همین موضوع واکسن تهیه شده را کاندید مناسبی بر علیه بیماری‌های پنوموکوکی و دیفتریایی می‌نماید.



	IgA	IgM	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
INJ1	18	90	315	170	21	12	140
INJ2	21	182	1180	490	36	39	390
INJ3	28	610	1680	750	52	66	710

شکل۵: نمودار مقایسه تیتر آنتی‌بادی در ۳ نوبت تزریق کونژوگه میکروپارتیکل کپسول پنوموکوک و توکسوئید دیفتری MICRO CPS-DT

در سال ۱۳۸۸ شاپوری و همکارانشان اقدام به تهیه کونژوگه الیگوپلی‌ساکارید *بروسلا آبورتوس* با توکسوئید کزاز کردند و میزان تحریک تولید آنتی‌بادی ضد کزاز توسط این کونژوگه را در مقایسه با توکسوئید خالص کزاز مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق واکسن کونژوگه به‌روش آمیداسیون تهیه شد. و ویژگی‌های ادجوانتی (OPS) الیگوپلی‌ساکاریدی *بروسلا آبورتوس* مورد بررسی قرارگرفت و پاسخ ایمنی ایجاد شده به‌وسیله واکسن کونژوگه (OPS-TT) بر علیه کزاز در مقایسه با توکسوئید کزاز خالص مقایسه گردید. نتایج به‌دست آمده به‌وضوح بالاتر بودن تیتر آنتی‌بادی القاء شده به‌وسیله واکسن کونژوگه OPS-TT را در مقایسه با TT خالص نشان داد که این امر بیان‌کننده خاصیت ادجوانتی OPS *بروسلا آبورتوس* برای توکسوئید کزاز می‌باشد (۵).

در سال ۲۰۱۴، امی و همکاران مطالعه‌ای روی ایمنی‌زایی کونژوگه آلژیناتی و LPS دتوکسیفای *بروسلا آبورتوس* با توکسوئید کزاز در موش نژاد BALB/c انجام دادند. در بررسی که این افراد انجام دادند، آلژینات را قبل از کونژوگه با توکسوئید کزاز دتوکسیفای کرده و LPS را نیز با روش فنل

داغ استخراج و دتوکسیفای نمودند. سپس با استفاده از روش آمیداسیون آلژینات و LPS را با توکسوئید کزاز کونژوگه و تیتر آنتی‌بادی‌های تولیدی علیه این دو آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی را اندازه‌گیری و تفسیر نمودند (۵،۱۴). تیتر آنتی‌بادی‌های IgM،IgA،IgG_1 ،IgG_2a ،IgG_2b ،IgG_3 تولید شده علیه آلژینات و LPS در حالت کونژوگه نسبت به حالت خالص آنها در هر سه تزریق به‌طور متوسط ۴/۴ برابر افزایش نشان دادند (۵). در این مطالعه که از توکسوئید دیفتری به‌عنوان حامل پروتئینی برای کونژوگاسیون با پلی‌ساکارید *استرپتوکوکوس پنومونیه* تیپ۶ حاوی آلژینات استفاده گردید، موفقیت‌آمیز بودن این واکسن در افزایش چشمگیر تیتر آنتی‌بادی‌های سرمی و پایداری ایمنی آنها در مدل حیوانی موش به اثبات رسید. علت استفاده از توکسوئید دیفتری، داشتن مجوز این توکسوئید در تولید واکسن و مصارف انسانی، سهولت تهیه و تولید آن در کشور ایران و موفقیت‌آمیز بودن این حامل پروتئینی در تمام پژوهش‌های صورت گرفته در تهیه واکسن در سال‌های اخیر بوده‌است.

پنوموکوک مثال خوبی برای یک انگل خارج سلولی است. این ارگانیسم تا زمانی که در خارج از سلول بیگانه‌خوار باقی می‌ماند بافت‌های میزبان را تخریب می‌کند. کپسول موجب حفاظت ارگانیسم در برابر فاگوسیتوز می‌شود. اگر با استفاده از آنزیم، کپسول پنوموکوک برداشته شود ارگانیسم به‌شکل غیربیماری‌زا و حساس در برابر فاگوسیتوز تبدیل خواهد شد. علاوه بر این آنتی‌بادی‌های ضد پلی‌ساکارید کپسولی به‌صورت اختصاصی با آن ترکیب می‌شوند و ارگانیسم را در برابر فاگوسیتوز، حساس می‌کنند (۴).

این کپسول پلی‌ساکاریدی به‌دلیل آنکه تنها قادر به تحریک ایمنی هومورال و القاء تولید آنتی‌بادی توسط لنفوسیت‌های B می‌باشد، یک آنتی‌ژن غیروابسته به تیموس بوده و پاسخ‌های ایمنی ضعیف و کوتاه‌مدتی را برمی‌انگیزد به‌طوری که میل ترکیبی کاملی ندارند و در نوزادان به‌ویژه کودکان زیر ۲ سال نیز به‌علت تأخیر در تکامل لنفوسیت‌های B، ایمنی نسبت به پلی‌ساکاریدها دیرتر و در سنین بالاتر ظاهر می‌شود. برای غلبه بر این مشکلات و افزایش ایمنی‌زایی پلی‌ساکاریدها بهترین راه، متصل نمودن پلی‌ساکارید به یک پروتئین حامل ایمونوژن است و بدین ترتیب یک آنتی‌ژن غیروابسته به تیموس به یک آنتی‌ژن وابسته به تیموس تبدیل می‌شود. این نوع واکسن‌های کونژوگه پلی ساکارید-پروتئین می‌توانند باعث تغییر کلاس آنتی‌بادی به IgG، ایجاد پاسخ‌های خاطره‌ای قوی در برابر پلی‌ساکارید و افزایش تمایل اتصال آنتی‌بادی‌های تولیدی به آنتی‌ژن پلی‌ساکاریدی شده و لنفوسیت‌های T-هلپر را به‌منظور کمک‌رسانی برای تولید آنتی‌بادی درگیر نمایند و نیز باعث برانگیخته شدن پاسخ ایمنی طولانی و پایدار حتی در سنین پایین شوند (۲۳،۲۴).

واکسن‌های کونژوگه به‌دلیل توانایی استفاده از دو آنتی‌ژن محافظتی (جزء سروتیپ ویژه و پروتئین حامل) جالب به‌نظر می‌رسد (۱۶،۱۷). همان‌طور که ذکر شد واکسن‌های کونژوگه توانایی تولید مقدار زیادی IgG در برابر پلی‌ساکارید را دارا می‌باشند و مدت دوام حفاظت علیه عفونت نیز نسبتاً طولانی است (۱۸،۱۹). این واکسن‌ها باعث برانگیختن آنتی‌بادی‌های هومورال حتی در کودکان و نوزادان نیز می‌شوند و از طرفی با توجه به مقاومت باکتری به فعال شدن مکمل از راه فرعی، تولید آنتی‌بادی‌های اُپسونین نقش مهمی در بلعیده شدن باکتری توسط ماکروفاژها دارد (۲۰،۳۶).

در بین این تحقیقات واکسن‌های تشکیل‌یافته از زیر واحدهای سلولی پنوموکوک که توانایی تحریک پاسخ‌های ایمنی‌زایی

سلولی از نوع Th1 را داشته باشند همواره موردنظر بوده‌اند. تعدادی از آنتی‌ژن‌های پروتئینی پنوموکوک در حیوانات آزمایشگاهی توانایی ایجاد پاسخ‌های هومورال و سلولی علیه پنوموکوک را دارند از جمله این آنتی‌ژن‌ها می‌توان پروتئین M، آنتی‌ژن F یا آنتی‌ژن فورسمن و پلی‌ساکارید C را نام برد. مطالعات نشان می‌دهند که این عوامل توانایی تسهیل فاگوسیتوز را دارند (۴،۲۱).

در مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۵ توسط چیبر و همکارانش پلی ساکارید استخراج شده از LPS *کلبسیلا پنومونیه* NFC5055به‌صورت کوآلان به توکسوئید تتانوس (کزاز) متصل کردند. محصول کونژوگه در دُز ۱۰۰ میکروگرم غیرسمی بوده و اثر تب‌زایی نداشته و اثر ایمنی‌زایی آن به‌واسطه کاهش باکتری در ریه را نشان دادند. هم‌چنین خاصیت فعال سازی ماکروفاژها در ریه را داشته و موجب فعال شدن ماکروفاژها در این قسمت شدند (۲۳).

شاپوری و همکاران با بررسی ایمنی‌زایی کونژوگه (PLGA) پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید با لیپوپلی‌ساکارید دتوکسیفای شده *پروتئوس میرابیلیس* علیه عفونت دستگاه ادراری در مدل موشی نشان داد که کونژوگه LPS-PLGA توانایی بهتری در پیشگیری از عفونت ادراری در موش سوری نسبت به LPS خالص دارد و می‌تواند سیستم ایمنی را بدون آثار مخرب در بافت‌های بدن تحریک کند (۲۶). چون و همکاران در سال ۲۰۱۹ به تهیه کونژوگه پلی‌ساکارید o(osp) *شیگلا دیسانتری* تیپ ۱ با توکسوئید کزاز به چندین روش اقدام نمودند و نشان دادند که روش آمیداسیون در مورد ساختارهای لیپوپلی‌ساکاریدی بهتر از بقیه روش‌ها سبب القاء پاسخ‌های ایمنی حفاظت بخش می‌شود که احتمالاً به‌دلیل ایجاد ساختارهای مشبک در روش آمیداسیون و استفاده از فاصله-گذار ADH است (۲۴).

در سال ۲۰۱۹ لیلا صفری زنجانی و همکاران در کار تحقیقاتی خود از کونژوگه PLGA و اگزوتوکسین A *سودوموناس آئروژینوزا* به‌عنوان واکسن کارکردند (۲۵).

درسال ۲۰۱۵ نجفی‌زاده و همکاران واکسن‌های کونژوگه لیپوپلی‌ساکارید- توکسین دیفتری و آلژینات-توکسین دیفتری را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه LPS-D و-ALG Dبا پیوند کووالان با روش آمیداسیون به DT به عنوان یک حامل پروتئینی، متصل شدند. نتایج نشان داد که آنتی بادی IgGموشهای ایمن شده با کونژوگه DT-LPS-D نسبت به موش‌هایی که فقط با LPS-D واکسینه شده بودند، ۴ برابر افزایش داشت هم‌چنین نتایج آنها نشان داد که واکسن کونژوگه بر اساس ALG-D *سودوموناس آئروژینوزا* و DT نسبت DT-LPS-D باعث افزایش بیشتر در تیتر آنتی‌بادی‌ها می-شود. این موضوع نشان می‌دهد که آلژینات ایمنی‌زایی بهتری ایجاد می‌کند. در این پژوهش نیز از آلژینات استفاده شد. از طرف دیگر مقایسه نتایج واکسن کونژوگه D-ALG-DT با D0-ALG-EXO A نشان می‌دهد که D-ALG-EXO A باعث افزایش بیشتری در تیتر آنتی‌بادی‌های ضد آلژینات می‌شود به‌طوری‌که بعد از سومین دُز تزریق تیتر IgG در کونژوگهDT-ALG-D کمی بیشتر از ۱۸۰۰ و در کونژوگه A Exo-ALG-Dبه ۲۱۰۰ افزایش یافت پس می‌توان نتیجه گرفت که A Exo به‌عنوان حامل پروتئینی که جزئی از باکتری است می‌تواند در ایجاد ایمنی‌زایی بهتر از توکسین دیفتری عمل کند (۳۰). در مطالعه حاضر نیز با افزودن یک ترکیب پروتئینی به بخش پلی‌ساکاریدی تیتر آنتی‌بادی‌ها

IgG2a IgG3, IgG1, IgG, IgG2b تولید شده علیه آلژینات به ترتیب ۲/۹، ۹/۲، ۵/۲، ۱۰ و ۳ افزایش یافت.

در سال ۲۰۱۹ صفری زنجانی و همکاران به ارزیابی ایمنی‌زایی ETAکونژوگه شده با نانوذرات PLGA به‌عنوان یک کاندید واکسنی در *سودوموناس آئروژینوزا* پرداختند. بر اساس نتایج، PLGA–ETA می‌تواند به‌عنوان یک ایمونوژن مناسب، پاسخ‌های IgG را در موش‌های ایمن‌شده نسبت به آنتی‌ژن ETA افزایش دهد (۲۷). در مطالعه حاضر نیز تیتر آنتی‌بادی IgG و زیرکلاس‌های آن بعد از سومین دُز تزریقی در گروه‌های واکسینه با ETA-ALG افزایش قابل‌توجهی را در مقایسه با گروه واکسینه با ALG خالص نشان داد. در بین حامل‌های مختلف پروتئینی، تنها حامل توکسوئید دیفتری و کزاز موفق به اخذ مجوز واکسن شده‌اند.

در سال ۲۰۱۱ نجفیان و شریفی مطالعه‌ای بر روی ایمنی‌زایی کونژوگه آلژینات و LPS دتوکسیفای *سودوموناس آئروژینوزا* با توکسوئید کزاز در موش نژاد BALB/c انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که عیار آنتی‌بادی‌های IgM ، IgA و IgG تولید شده علیه آلژینات و LPS در حالت کونژوگه نسبت به حالت خالص در هر سه تزریق به‌طور متوسط دو تا سه برابر افزایش می‌یابد (۳۱). در مطالعه حاضر نیز تیتر آنتی‌بادی‌های تولیدی بر علیه آلژینات به‌صورت کونژوگه بیش از آلژینات خالص بود . به‌طوری که میزان تیتر IgG تولید شده در سه تزریق به‌طور متوسط ۳/۵ برابر افزایش نشان داد. IgM, ایمونوگلوبولین اصلی در پاسخ اولیه است و از مؤثرترین ایمونوگلوبولین‌ها در آگلوتیناسیون و تثبیت سیستم کمپلمان محسوب می‌شود (۲۹).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم دکتر پریوش قادری‌نیا به‌دلیل همکاری صمیمانه و مجدانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Adib Far, Medical Microbiology, 1383, Mehr Publications, pp. 95-97 [Persian].

2. Jaklik, Wilt, Amos, Wilfert, Zinser Microbiology, 2013, Ayge Publications, Volume II, pp. 92-77 [Persian].

3. Jawetz,Melnick&Adelberg . Medical Microbiology, 22nd, 2001; 342-346.

4. Lambertsen L, Kerrn MB. Test of a novel Streptococcus pneumoniae serotype 6C type specific polyclonal antiserum (factor antiserum 6d) and characterisation of serotype 6C isolates in Denmark. BMC Infectious Diseases. 2010 Dec;10:1-7.

5. Ghaderinia P, Shapouri R. Assessment of immunogenicity of alginate microparticle containing Brucella melitensis 16M oligo polysaccharide tetanus toxoid conjugate in mouse. Banat's Journal of Biotechnology. 2017 Jul 1;8(16):83-92.

6. Lesinski GB, Westerink J. Vaccines against polysaccharide antigens. Current Drug Targets-Infectious Disorders. 2001 Nov 1;1(3):325-34..

7. Rådström P, Bäckman A, Qian NY, Kragsbjerg P, Påhlson C, Olcén P. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and streptococci using a seminested PCR

strategy. Journal of clinical microbiology. 1994 Nov;32(11):2738-44.

8. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal conjugate vaccines. Archives of disease in childhood. 2003 May 1;88(5):375-8.

9. Cohen N, Stolarsky-Bennun M, Amir-Kroll H, Margalit R, Nussbaum G, et-al, Pneumococcal capsular polysaccharide is immunogenic when present on the surface of macrophages and dendritic cells: TLR4 signaling induced by a conjugate vaccine or by lipopolysaccharide is conducive. The Journal of Immunology. 2008 Feb 15;180(4):2409-18.

10. Tian H, Groner A, Boes M, Pirofski LA. Pneumococcal capsular polysaccharide vaccine-mediated protection against serotype 3 Streptococcus pneumoniae in immunodeficient mice. Infection and immunity. 2007 Apr;75(4):1643-50.

11. Trück J, Lazarus R, Jonsdottir I, Klugman KP, Pollard AJ. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy and routine use of conjugate vaccines in infants: there is no need for a vaccine program in older adults at present. Clinical infectious diseases. 2012 Dec 1;55(11):1577-9.

12. Shen X, Lagergård T, Yang Y, Lindblad M, Fredriksson M, Holmgren J. Group B Streptococcus capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccines prepared by different methods for intranasal immunization. Infection and immunity. 2001 Jan 1;69(1):297-306.

13. Yun KW, Choi EH, Lee HJ, Kang JH, Kim KH, Kim DS, Kim YJ, Eun BW, Oh SH, Cho HK, Hong YJ. Genetic structures of invasive Streptococcus pneumoniae isolates from Korean children obtained between 1995 and 2013. BMC infectious diseases. 2018 Dec;18(1):1-1.

14. Bastiaens GJ, Cremers AJ, Coolen JP, Nillesen MT, Boeree MJ, Hopman J, Wertheim HF. Nosocomial outbreak of multi-resistant Streptococcus pneumoniae serotype 15A in a centre for chronic pulmonary diseases. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018 Dec;7(1):1-4.

15. Baek JY, Kim SH, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH, Ko KS. Emergence of an extensively drug-resistant (XDR) Streptococcus pneumoniae serotype 15A by capsular switching. International Journal of Medical Microbiology. 2018 Dec 1;308(8):986-9.

16. Arushothy R, Ahmad N, Amran F, Hashim R, Samsuddin N, Che Azih CR. Draft genome sequence of a highly resistant Streptococcus pneumoniae Serotype 15A strain isolated from blood. Genome announcements. 2018 Apr 19;6(16):e00167-18.

17. Baek JY, Kim SH, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH, Ko KS. Emergence of an extensively drug-resistant (XDR) Streptococcus pneumoniae serotype 15A by capsular switching. International Journal of Medical Microbiology. 2018 Dec 1;308(8):986-9.

18. Perrone MR, Romano S, De Maria G, Tundo P, Bruno AR, Tagliaferro L, Maffia M, Fragola M. Compositional Data Analysis of 16S rRNA Gene Sequencing Results from Hospital Airborne Microbiome Samples. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2022 Aug 16;19(16):10107.

19. Büyükcam A, Güdücüoğlu H, Karaman K, Gürbüz V, Aliyev E, Kara A, Ceyhan M. Invasive pneumococcal infection due to serotype 15A after the pneumococcal conjugate vaccine implementation in Turkey. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 2017 Aug 3;13(8):1892-4.

20. Watkins RR, Holubar M, David MZ. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus to newer antimicrobial agents. Antimicrobial agents

and chemotherapy. 2019 Dec;63(12):e01216-19.

21. Durmort C, Brown J. Pneumococcal ABC transporters and their role in physiology and multidrug resistance. Streptococcus pneumoniae molecular mechanisms of host-pathogen interactions. 2015:181-202.

22. Shi W, Yao K, He M, Yu S, Yang Y. Population biology of 225 serogroup 6 Streptococcus pneumoniae isolates collected in China. BMC Infectious Diseases. 2014 Dec; 14:1-7.

23. Chhibber S, Rani M, Yadav V. Immunoprotective potential of polysaccharide-tetanus toxoid conjugate in Klebsiella pneumoniae induced lobar pneumonia in rats.

24. Cohen D, Meron-Sudai S, Bialik A, Asato V, Goren S, Ariel-Cohen O, Reizis A, Hochberg A, Ashkenazi S. Serum IgG antibodies to Shigella lipopolysaccharide antigens–a correlate of protection against shigellosis. Human vaccines & immunotherapeutics. 2019 Jun 3;15(6):1401-8.

25. Safari Zanjani L, Shapoury R, Dezfulian M, Mahdavi M, Shafieeardestani M. Preparation of PLGA (poly lactic-co-glycolic acid) nanoparticles Containing Pseudomonas aeruginosa Alginate, LPS and Exotoxin A as a Nano-vaccine. Biological Journal of Microorganism. 2018 Jun 22;7(26):11-27.

26. Shapouri R. Evaluation of Immunogenicity of PLGA-Proteus mirabilis Detoxified Lipopolysaccharide Conjugate Against Urinary Tract Infection in Mice.

27. Safari Zanjani L, Shapouri R, Dezfulian M, Mahdavi M, Shafiee Ardestani M. Exotoxin A-PLGA nanoconjugate vaccine against Pseudomonas aeruginosa infection: protectivity in murine model. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2019 Jun; 35:1-9.

28. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. Infection and immunity. 2003 Jul;71(7):3875-84.

29. Abu-Baker NF, Masoud H. Synthesis, characterization, and immunological properties of LPS-based vaccines composed of O-polysaccharides conjugated with recombinant exoprotein a from Pseudomonas aeruginosa. Advances in Microbiology. 2016;6(04):332.

30. Najafzadeh F, Shapouri R, Rahnema M, Azar SR, Kianmehr A. Pseudomonas aeruginosa PAO-1 lipopolysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine: preparation, characterization and immunogenicity. Jundishapur Journal of Microbiology. 2015 Jun 1;8(6).

31. Najafian M. Immunological evaluation of Pseudomonas aeruginosa alginate conjugated to tetanus toxoid in mice as a vaccine candidate. M. Sc. Zanjan Branch. Islamic Azad University. Iran.[In Persian]. 2011.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 16, Issue 1, Number 61, Pages 84-100
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

The immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* type 6 alginate conjugate and diphtheria toxoid in BALB/C mouse model

Bahram Sanati Monfared[1], **Reza Shapoury [2]**

1- MSc student in microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran. Corresponding author: rezashapoury@yahoo.com.

Received:2022.08. 28 **Accepted: 2022.12.03**

Abstract

Inroduction & Objective: *Streptococcus pneumoniae* is one of the infectious pathogenic bacteria in humans. It is considered the cause of pneumonia. It is colonized in the respiratory system of susceptible people such as immunocompromised and AIDS patients and causes chronic and treatment-resistant infections. The aim of the present study is to prepare a vaccine with a conjugated antigen combination and with the ability to induce antibodies and memory immunity experimentally against *Streptococcus pneumoniae* type 6 in the BALB/C mouse model.

Material and Methods: *Streptococcus pneumoniae* type 6 strain was cultured in Mueller Hinton agar and at the end of the logarithmic phase of growth, it was extracted and concentrated by normal NaOH. The polysaccharide capsule was attached to diphtheria toxoid using (ADH) adipic acid dihydrazide and EDAC. After chromatography, prepare by mixing the polysaccharide capsule conjugate (CPS-DT) with diphtheria toxoid and alginate solution of the desired antigen. The prepared antigens were injected into 4 groups of 15 mice intraperitoneally with two-week intervals. In serum samples, antibody responses were measured by ELISA method.

Results: According to the results of the ELISA test, total IgG titer increased from 315 to 1680. Also, IgM and IgA antibody titers increased from 90 to 610 and 18 to 28, respectively. The serum antibodies of the group vaccinated with diphtheria toxoid alginate (ALG-DT) increased statistically significantly after each injection. So that the titer of total IgG, IgM and IgA produced against alginate in the groups vaccinated with conjugate showed a significant increase compared to specific alginate in three injections.

Conclusion: The results obtained for the above antibodies were CPS-DT > CPS > DT, and the antibody titer against DT-CPS in IgG was higher than other antibodies, which shows that microparticles Alginate polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* in conjugated form with diphtheria toxoid increases antibodies. The increase in antibody titer in the groups vaccinated with alginate conjugate indicates the activation of T cells and the creation of immune memory. Therefore, the conjugate of alginate and diphtheria toxoid can be a suitable candidate for preparing a vaccine. The results of the antibody titer obtained against Micro CPS-DT in the groups were IgG>IgM>IgA.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, diphtheria toxoid, conjugation, type VI polysaccharide capsule, alginate microparticle.