Journal of Microbial World
Volume 13, No. 1, April 2020

Original Article

The effect of adjuvants on the efficacy and safety of anti-diarrhea *Escherichia coli* O157:H7 vaccine

Nahid Haidari[1], Yahya Tahamtan[2], Hajar Molaee[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. [2]Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum research Institute Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Enterohemorrhagic Escherichia coli* is one of the major reasons for diarrhea, but despite the recent vast development, there is still no comprehensive treatment for this infection. The aim of the present study is the investigation of the role of different adjuvants for preparation of the vaccine against this bacteria.

Materials & Methods: First, the bacteria were cultured on its special culture media and then inactivated by formaldehyde for antigen preparation and injection into the mice. Female Balb/c mice were injected subcutaneously with four different bacterial groups including, bacteria with alum adjuvant (AO), montanide adjuvant (MO), non-adjuvant bacteria (O) and control group(C). The ELISA test was used for evaluation of antibody titer. Mice were challenged 28 days after post immunization.

Results: The highest antibody titer was obtained for the AO group, but the montanide adjuvanted bacteria has more antibody titer in the first month. Also, challenge results exposed that the AO group conferred 100 % protection for the studied mice.

Conclusion: Results showed that the produced antibody of the alum adjuvant keep higher the animal's immune system for a longer period. Since vaccine design to prevent infectious diseases requires effective antigen delivery system, this study could be a new strategy to produce the *E. coli* O157:H7 vaccine.

Keywords: Pathogenic *Escherichia coli*, diarrhea, adjuvant, vaccine.

Correspondence to: Yahya Tahamtan

Tel: +98 9177117490

E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com

Journal of Microbial World 2020, 13(1): 36-46.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره اول (پیاپی ۴۲) بهار ۱۳۹۹
صفحات ۴۶-۳۶

Original Article

تاثیر رویکرد استفاده از اجوانت ها بر میزان کارآیی و ایمنی زایی واکسن ضداسهال *اشریشیا کلی* O157:H7

ناهید حیدری[۱]، یحیی تهمتن*[۲]، هاجر مولایی[۲]

[۱]دانش آموخته میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، [۲]بخش میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: انترو هموراژیک *اشریشیا کلی* از مهمترین عوامل ایجاد اسهال می باشد، اما با وجود پیشرفت های اخیر، درمان مؤثری برای عفونت ایجاد شده با این باکتری وجود ندارد. این پژوهش با هدف ارزیابی نقش اجوانت های مختلف به منظور تهیه واکسن این باکتری انجام شد.

مواد و روش ها: ابتدا کشت باکتری در محیط اختصاصی انجام شد و سپس به منظور تهیه آنتی ژن و تزریق به موش، با افزودن فرمالین غیر فعال گردید. چهار گروه مختلف باکتری غیر فعال شده، همراه اجوانت آلوم (AO)، اجوانت مونتاناید (MO)، بدون اجوانت (O) و کنترل (C) به صورت زیر جلدی به موش آزمایشگاهی ماده Balb/C تزریق گردید. از آزمون الیزا به منظور سنجش عیار آنتی بادی استفاده شد. موش ها ۲۸ روز پس از ایمنی زایی به چالش کشیده شدند.

یافته ها: بیشترین میزان عیار آنتی بادی از تزریق باکتری با اجوانت آلوم به دست آمد، اما اجوانت مونتاناید در ماه اول تیتر آنتی بادی بالاتری داشت. چالش تایید کرد که گروه AO توانایی ایجاد محافظت در ۱۰۰ درصد موش های مورد بررسی را دارد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که پادتن تولید شده با اجوانت آلوم ایمنی در حیوان را برای طولانی مدت نگه می دارد. از آنجا که طراحی واکسن برای جلوگیری از بیماری های عفونی نیاز به سیستم تحویل آنتی ژن کارآمد دارد، این تحقیق می تواند راهبرد جدیدی برای تولید واکسن علیه *اشریشیا کلی* باشد .

واژگان کلیدی: *اشریشیاکلی* بیماری زا، اسهال، اجوانت، واکسن.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۹

مقدمه

امروزه بشر با بیماری های عفونی رو به رو است که توسط عوامل میکروسکوپی ایجاد می شود. یکی از این عوامل باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) می باشد. *اشریشیا کلی* برای اولین بار در سال ۱۸۸۵ توسط یک متخصص کودکان در آلمان به نام تئودور ایشریش (Theodor Escherich) شناسایی شد (۱).

اشریشیا کلی، ارگانیسم متحرکی است که به خوبی بر روی محیط کشت معمولی رشد می کند. این باکتری هوازی و بی هوازی اختیاری است و بر روی محیط مک کانکی آگار کلنی های گرد، برجسته، صاف و صورتی ایجاد می کند. کلنی های آن با یک جلای فلزی بر روی آگار ائوزین متیلین بلو (EMB) و مثبت شدن آزمون اندول (تبدیل تریپتوفان به اندول) به سرعت تشخیص داده می شود. این باکتری ها لاکتوز

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع الکترونیک موسسه رازی شیراز.
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۷۹۴۰ پست الکترونیک: yahyatahamtan@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

مثبت می باشند و همچنین دارای پیلی هستند (۲). *اشریشیا کلی* در شرایط بی هوازی، مخلوطی از اسید ها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول و دی اکسیدکربن را تولید می کند. جایگاه طبیعی این باکتری روده بزرگ اکثر حیوانات خونگرم مانند گاو و گوسفند است و اغلب در روده ماهی و حیوانات خونسرد دیگر دیده نمی شود. فراورده های لبنی و گوشتی آلوده این حیوانات، مهمترین منبع آلودگی انسان به خصوص در کشور های توسعه یافته محسوب می شود (۳). تعداد این باکتری در روده گوشتخواران و انسان و میمون بیش از روده علفخواران است و به عنوان عامل مسمومیت غذایی انواع غذا ها از جمله شیر مطرح می باشد (٤). راه انتقال باکتری از طریق آب و غذای آلوده است. از جمله پاتوتیپ های مختلف *اشریشیاکلی* که باعث ایجاد اسهال می شوند، می توان به *اشریشیا کلی* انتروتوکسی ژنیک (ETEC)، *اشریشیا کلی* انتروپاتوژنیک (EPEC) و *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک (EHEC) اشاره کرد. *اشریشیاکلی* انترو هموراژیک یک سم قوی به نام وروتوکسین یا شیگاتوکسین تولید می کند. به این گروه *اشریشیا کلی* مولد شیگا توکسین (STEC) و یا وروتوکسیژنیک *اشریشیا کلی* هم گفته می شود. به دلیل توانایی این سم در کشتن سلول های ورو به آنها وروتوکسین، و به دلیل شباهت به نوروتوکسین شیگای مترشحه از *شیگلا دیسنتریه* تیپ I، توکسین شبه شیگا نامیده می شود (۵). از میان بیش از ۱۵۰ سروتایپ *اشریشیاکلی* تولید کننده توکسین شیگا، *اشریشیا کلی* O157:H7 شایع ترین آنها است. سویه O157:H7 یکی از عوامل اصلی بیماری زا در انسان می باشد که در غذاها و آب های آلوده یافت می شود (٦). این باکتری دارای دز عفونی پایین بوده و با تعداد کم ایجاد عفونت می نماید (۷). با وجود این که زمان زیادی از کشف *اشریشیا کلی* O157:H7 به عنوان پاتوژن روده ای گذشته، هنوز هم درمان قطعی برای آن وجود ندارد و انواع راهبردهای درمان و پیشگیری در مرحله آزمایشگاهی و در حال توسعه هستند. به نظر می رسد آنتی بیوتیک تأثیر چندانی بر کاهش شدت بیماری نداشته باشد. از دلایل مفید نبودن مصرف آنتی بیوتیک حذف ارگانیسم های رقابت کننده با عوامل بیماری زای *اشریشیا کلی* O157:H7 (۸، ۹) و فعال شدن فاز سیستم SOS و تبدیل فاز لیزوژنیک به لیتیک و آزاد شدن بیشتر توکسین بر شمرده می شود (۱۰). از این رو استفاده از واکسن برای پیشگیری از بیماری مفید خواهد بود. ملکی (Maleki) و همکاران در سال ۱۳۹۲ برای ساخت واکسن خوراکی از پروتین های باکتری *E.coli* O157:H7 استفاده کردند. ژن های مربوط به پروتین دوگانه EspA-Tir از باکتری استخراج کرده و با واسطه پلاسمید به باکتری *اگروباکتریوم تومی فشنس* منتقل کرده و سپس به گیاه تنباکو انتقال دادند. نتایج نشان داد که میزان ۰/۸ درصد از کل پروتئین های برگ متعلق به پروتین نوترکیب می باشد (۱۱). تا کنون واکسن *اشریشیا کلی* O157:H7 توسعه نیافته و دارای مجوز برای ایمن سازی انسان نیست. یکی از روش های افزایش اثر بخشی واکسن استفاده از اجوانت می باشد. واژه اجوانت از کلمه لاتین adjuvant به معنی کمک یا افزایش مشتق شده است (۱۲). اجوانت ها ترکیباتی هستند که واکنش ایمنی علیه آنتی ژن های تلقیح شده با آن را افزایش می دهند (۱۳). به طور کلی به نظر میرسد اجوانت ها موجب افزایش میزان عرضه آنتی ژن و پایداری آن می شود (١٤). از جمله شناخته شده ترین اجوانت ها، فروند و آلوم می باشد. نمک های آلوم، بیشتر به صورت فسفات آلومینیوم یا هیدروکسید آلومینیوم به شکل گسترده ای به عنوان اجوانت های انسانی استفاده شده اند. اجوانت فروند یک امولسیون آب در روغن است که آنتی ژن را در فاز مایع به کمک یک ماده ی امولسیون ساز وارد روغن پارافین سبک وزن می کند. این نوع اجوانت فروند ناقص نامیده می شود. اضافه کردن باکتر های *مایکوباکتریوم* کشته شده و خشک شده به فاز روغنی، ایمنی سلولی و هومورال را بر می انگیزد (۱۵). به منظور انتخاب اجوانت مناسب باید معیار های مشخصی از جمله نوع آنتی ژن، گونه های هدف، نوع پاسخ ایمنی و همچنین مدت پاسخ ایمنی مد نظر قرار گیرد. استفاده از اجوانت منجر به افزایش ایمنی زایی آنتی ژن های ضعیف گردیده و در افزایش سرعت و دوام پاسخ ایمنی نقش دارد (١٦). با توجه به اینکه اجوانت های متفاوتی به منظور افزایش ایمنی زایی استفاده می شود، مطالعه در این زمینه هنوز

ادامه دارد. دوآوی (Doavi) و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانو واکسنی بر پایه ادجوانت کیتوزان و تری متیل کیتوزان طراحی کردند و ایمنی زایی در موش علیه *E.coli* O157 با استفاده از واکسن یادشده مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷). با توجه به نیاز بشر به منظور گسترش واکسن علیه بیماری اسهال، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی ایمنی زایی حیوان آزمایشگاهی با آنتی ژن *Escherichia coli* O157:H7 و با اجوانت های مونتانایید و آلوم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی باکتری: باکتری *اشریشیا کلی EDL 933* O157:H7 از دانشگاه ادینبرگ انگلستان تهیه شد. پس از کشت و رشد باکتری در محیط بلاد آگار، DNA مورد استفاده باکتری در آزمایشگاه مولکولی با روش جوشاندن استخراج شد. به دنبال آن تست واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای *stx1* و *stx2* (جدول ۱) انجام، سپس به منظور بررسی محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز، با لودینگ بافر ۱۰X مخلوط گردید و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد به همراه بافر TBE انجام شد. در نهایت به وسیله رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده ی باند های تشکیل شده با تاثیر نور UV، حضور ژن های مورد نظر تأیید و تشخیص داده شد. پس از تأیید نهایی باآزمون های های آنتی سرمی و واکنش زنجیره ای پلی مراز، باکتری غیرفعال و به منظور تزریق به موش آماده گردید (۱۸).

کشت باکتری در محیط بلاد آگار: نمونه باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 از فریزر ۷۰- درجه خارج کرده و بعد از دفریز شدن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس زیر هود بیولوژیک بر روی بلاد آگار به صورت خطی کشت داده شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار گرفت تا باکتری رشد کند.

کشت باکتری در محیط TSB: بعد از رشد باکتری *اشریشیاکلی* بر روی محیط بلاد آگار در زیر هود بیولوژیک به وسیله لوپ استریل یک کلنی از باکتری را برداشته و درون لوله حاوی محیط TSB (HIMEDIA) کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت درون انکوباتور شیکر دار قرار گرفت (۱۹).

غیر فعال سازی باکتری: باکتری *اشریشیا کلی* کشت داده شده در محیط TSB با استفاده از فرمالین ۰/۳ درصد غیر فعال شد. باکتری غیر فعال به عنوان آنتی ژن برای تزریق زیر جلدی به موش استفاده شد (۲۰).

اطمینان از غیر فعال سازی باکتری: باکتری غیر فعال شده توسط فرمالین روی محیط بلاد آگار کشت داده و به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری گردید. عدم رشد باکتری روی محیط بلاد آگار تعیین کننده موفقیت آمیز بودن غیرفعال سازی می باشد (۲۰).

حیوان آزمایشگاهی: در این تحقیق از موش آزمایشگاهی ماده Balb/C به عنوان مدل حیوانی استفاده شد. این موش ها از بخش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز تهیه شدند. موش ها تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۰-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و به راحتی به آب و غذا دسترسی داشتند.

ایمن سازی موش آزمایشگاهی: ۵۰ سر موش آزمایشگاهی ماده Balb/C که وزن شان بین ۱-۲۲ گرم است به صورت تصادفی انتخاب گردید. موش ها به ٤ گروه که هر گروه شامل ۱۰ سر موش ماده بود، تقسیم شدند. پودر هیدروکسید آلومینیم با غلظت نهائی چهار درصد در آب مقطر حل شد. سپس به صورت یک به یک به نمونه

جدول ۱: توالی پرایمر ها.

ژن	توالی پرایمر (3’ → 5’)	طول قطعه (جفت باز)
O157	CGT GAT GAT GTT GAG TTG AGA TTG GTT GGC ATT ACT G	٤۲۰
Stx1	TTC GCT CTG CAA TAG GTA TTC CCC AGT TCA ATG TAA GAT	٥٥٥
Stx2	GTC CCT GTT ACT GGG TTT TTC TTC AGG GGT CGA TAT CTC TGT CC	۱۱۸

آنتی ژن غیر فعال شده با فرمالین اضافه گردید. در نهایت غلظت ژل در محلول دو درصد بدست آمد. همچنین روغن مونتاناید و آنتی ژن نیز به میزان (v/v) ۵۰ :۵۰ مخلوط شده و سپس به موش تزریق شد. گروه آزمون یک (باکتری غیر فعال شده به همراه ژل آلوم)، به موش های این گروه ۵۰۰ میکرولیتر باکتری غیر فعال شده به همراه ژل آلوم به صورت زیر جلدی تزریق شد (گروه AO). گروه آزمون دو (باکتری غیر فعال شده به همراه اجوانت روغن مونتاناید)، موش های این گروه ۵۰۰ میکرولیتر باکتری غیر فعال شده به همراه روغن مونتاناید به صورت زیر جلدی دریافت کردند (MO). گروه آزمون سه (باکتری غیر فعال شده بدون اجوانت)، این گروه ۵۰۰ میکرولیتر باکتری فرمالینه به صورت زیر جلدی دریافت کردند (O). گروه آزمون چهار (گروه کنترل منفی)، به گروه کنترل تنها ۵۰۰ میکرولیتر محیط TSB به صورت زیر جلدی تزریق شد (گروه C). تزریق دز یادآور به همه گروه ها دو هفته بعد به همین صورت بالا تکرار گردید.

خون گیری از موش: از موش های گروه های مختلف به صورت هفتگی از هفته اول پس از تزریق دوم تا هفته هفتم خون گیری انجام شد. خون گیری از صورت موش ها انجام شد. سرم خون موش پس از جدا سازی تا زمان انجام آزمون در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

تهیه سویه حاد باکتری اشریشیاکلی: به منظور مشخص نمودن حداقل دز کشنده ی باکتری، ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از کشت ۲٤ ساعته باکتری در محیط TSB به دو سر موش به صورت زیر جلدی تزریق گردید و پس از مرگ موش ها، اندام های حساس مانند ریه، کبد، طحال و کلیه جداسازی و بر روی محیط بلادآگار کشت داده و کلنی های *اشریشیاکلی* جمع آوری شدند. این مرحله با تزریق سوسپانسیون کلنی های بدست آمده به دو سر موش دیگر و جداسازی باکتری از اندام های حیوان تکرار شد. بدین ترتیب سویه حاد باکتری تهیه و برای تعیین LD50 مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین غلظت های کشنده باکتری ($LD_{۵۰}$): به منظور تعیین حداقل دز کشنده باکتری، ۱۰ رقت متوالی از کشت سویه حاد باکتری در محیط TSB تهیه و هر کدام جداگانه به یک موش تزریق شد. برای رقیق سازی از سرم فیزیولوژی استفاده گردید. بدین منظور ۱۰ لوله استریل انتخاب و درون هر لوله ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شد. سپس یک میلی لیتر از کشت ۲٤ ساعته باکتری در محیط TSB به لوله شماره یک اضافه گردید. ترکیبات درون لوله یک به خوبی مخلوط و یک میلی لیتر از آن به لوله شماره ۲ منتقل شد. مخلوط نمودن ترکیبات و سپس انتقال یک میلی لیتر از آن به لوله بعدی تا آخرین لوله تکرار شد. در نهایت پس از مشخص نمودن غلظت و تعداد باکتری در هر لوله، ۰/۵ میلی لیتر از هر رقت به یک سر موش تزریق گردید. بعد از گذشت ۲٤ ساعت با بررسی حیوانات تلف شده، رقت های کشنده باکتری مشخص شدند. مرحله بعد، از دو رقت مناسب (آخرین رقتی که موش را کشته بود و رقت بعد از آن) هر کدام به میزان ۰/۵ میلی لیتر به ۱۰ سر موش دیگر تزریق و از میان این دو رقت دز LD_{50} که ۵۰٪ حیوانات را کشت، مشخص گردید. در تمامی مراحل، کدورت سوسپانسیون تزریقی با استفاده از استانداردهای نیم مک فارلند و همچنین میزان جذب نوری (Optical density) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه گیری شد.

آزمون چالش: به منظور انجام چالش در هفته چهارم، از هر گروه نصف موش ها انتخاب و بصورت داخل صفاقی به میزان ۰/۵ میلی لیتر از دز LD50 را دریافت کردند. موش های چالش شده به مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

آزمون الیزا: برای بررسی سطح تیتر آنتی بادی در نمونه های سرم های جداسازی شده از موش های تحت آزمون، از تست الیزا استفاده شد.

تهیه آنتی ژن برای انجام آزمون الیزا: بمنظور تهیه آنتی ژن جهت تست الیزا، به محیط کشت ۲٤ ساعته باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 در TSB فرمالین ۰/۳ درصد اضافه شد. باکتری غیرفعال شده با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و با جدا کردن محلول رویی، رسوب مورد نظر دو بار به وسیله PBS شسته شد تا فرمالین اضافی از محیط خارج گردد. سپس

OD باکتری با استفاده از اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد. *طراحی الیزا:* با انجام تست الیزای شطرنجی، تست الیزا برای ارزیابی آنتی بادی ضد *E.coli* O157:H7 در موش های ایمن سازی شده و موش های گروه کنترل، با پارامترهای ذیل طراحی و استاندارد گردید. 1×10^{6} CFU/ml آنتی ژن (باکتری *E.coli* O157:H7) در کف پلیت کت شد، پس از ۲٤ ساعت به وسیله بافرفسفات/توئین ۲۰ شستشو داده و سپس آلبومین سرم گاوی یک درصد (بلاکر)اضافه گردید. پس ازشستشو، سرم موش با رقت یک به ۵۰ اضافه شد. سپس آنتی بادی ضد موشی کونژوگه با آنزیم پراکسیداز با رقت ۱/٤۰۰۰ اضافه و در انتها سوبسترای TMB اضافه گردید و در دمای اتاق ۱۵ دقیقه برای ایجاد رنگ زمان داده شد و در آخر برای اتمام واکنش از اسید سولفوریک استفاده گردید. نتایج با دستگاه قرائت کننده الایزا ثبت شد.

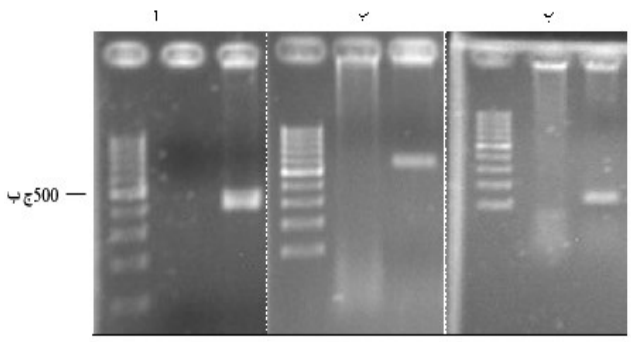
آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و نرم افزار *SPSS* نسخه ۱۸ انجام گرفت. نتایج هر آزمون با استفاده از آزمون *t* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این آنالیز آماری درجه معنی داری آن با میزان خطای ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

کشت باکتری: وجود کلنی های شیری رنگ، با سطح برآمده و حاشیه صاف و غیر همولیتیک بر روی محیط کشت ۲٤ ساعته بلاد آگار، نشان دهنده رشد موفق *اشریشیا کلی* می باشد. *شناسایی ژن های عوامل بیماری زایی توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز:* نتایج واکنش زنجیره ای پلی مراز در شکل ۱ آورده شده است. شکل ۱ (الف) پرایمر *O157* به منظور شناسائی ژن یادشده می باشد. (ب) شناسایی ژن *stx1* (توکسین باکتری) و (پ) نیز *stx2* (توکسین دیگر باکتری) را رد یابی کرده است. *غیر فعال سازی:* عدم رشد باکتری فوق بر روی محیط بلاد آگار نشان دهنده غیر فعال شدن موفقیت آمیز باکتری است. *ایمن سازی و سلامت واکسن:* آنتی ژن باکتری غیر فعال با دز 1×10^{9} CFU/ml به موش ها تزریق شد. کلیه موش های ایمن سازی شده در گروه های مختلف تا هشت هفته پس از تزریق اول زنده بودند و هیچ گونه علایم بیماری نداشتند.

تهیه سویه حاد باکتری و تعیین LD_{50}: به منظوربررسی کارایی ایمونوژن، سویه حاد با تزریق دز 1×10^{7} CFU/ml در سوسپانسیون باکتری به موش و جداسازی مجدد آن از اندام های حساس مانند ریه، کبد، کلیه و طحال حیوان تهیه گردید. ۲٤ ساعت پس از تزریق، کشت رقیق نشده باکتری و رقت های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ باعث مرگ موش ها شده بود. کدورت سوسپانسیون باکتری قبل از تزریق با استانداردهای مک فارلند محاسبه گردید. بنابراین برای تعیین LD_{50}، دو رقت ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ هر کدام به میزان ۰/۵ میلی لیتر به ۱۰ سر موش تزریق گردید. پس از ۲٤ ساعت با تلف شدن ۷ سر موش دریافت کننده رقت ۱/۱۰۰ و ٦ سر موش دریافت کننده رقت ۱/۱۰۰۰ غلظت 1×10^{4} به عنوان دز مناسب LD_{50} در نظرگرفته شد.

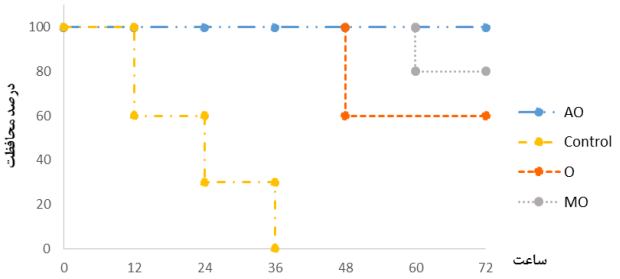
آزمون الیزا: نتایج به دست آمده از تست الیزا جهت ارزیابی آنتی بادی ضد *E.coli* O157:H7 در موش های گروه های مختلف در شکل ۲ آورده شده است. شکل (۳آ) تغییر تیتر آنتی بادی مربوط به گروه AO (باکتری و اجوانت آلوم) را نشان می دهد، که پس از تزریق دوم به تدریج تیتر آنتی بادی افزایش می یابد تا در هفته چهارم به بیشترین سطح خود می رسد. این گروه با گروه کنترل منفی (محیط کشت TSB) تفاوت معنی داری را نشان داد ($p \leq 0.05$). شکل (۲ب) مربوط به گروه MO



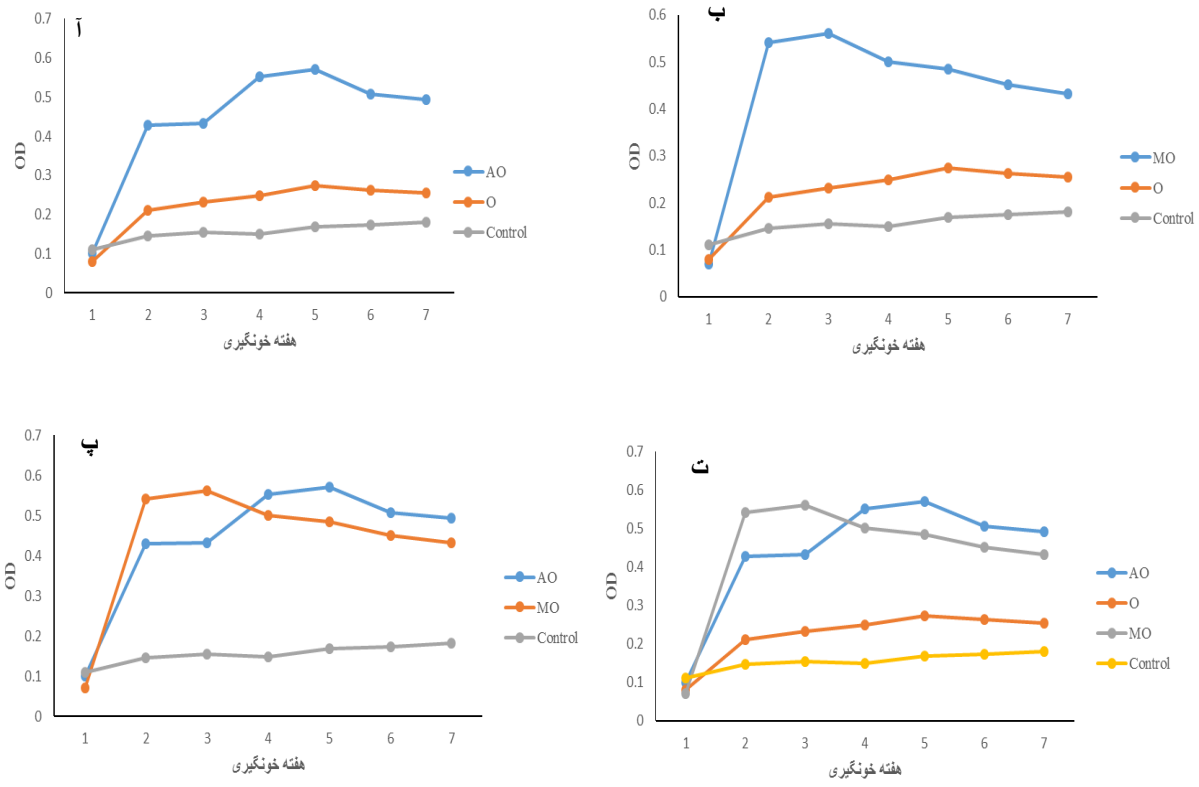
شکل ۱: نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز و تشکیل باندهای *اشریشیا کلی* (الف) باند ٤۲۰ پرایمر O157، (ب) باند ۵۵۵ پرایمر *stx1*، (پ) باند ۱۱۸ پرایمر *stx2* را نشان می دهد (ج ب: جفت باز).

(باکتری و مونتاناید) می باشد که باز هم پس از تزریق دوم افزایش تیتر آنتی بادی مشاهده شد، نتایج این گروه نیز با گروه کنترل منفی تفاوت معنی داری داشت. همانطور که در شکل (۲پ) مشخص است، در هفته اول و دوم سطح عیار آنتی بادی در گروه MO بالاتر از گروه AO بود، اما پس از هفته دوم عیار آنتی بادی در گروه MO نسبت به گروه AO کاهش داشت (شکل ۳پ). بنابراین عیار آنتی بادی در یک ماهه اول در گروه MO به مراتب کمتر از گروه AO بود. بنابراین باکتری *E.coli* O157:H7 همراه با اجوانت آلوم می تواند سیستم ایمنی حیوان را به مدت طولانی تر و بالاتری تحریک کند. با توجه به نمودار شکل (۲ت)، عیار آنتی بادی در گروه O (باکتری بدون اجوانت) نسبت به سایر گروه ها افزایش چندانی را نشان نداد، اما نسبت به گروه کنترل منفی (محیط کشت TSB) تفاوت معنا داری داشت. گروه AO نسبت به گروه آزمون O افزایش بیشتری در سطح عیار آنتی بادی را نشان داد، این دو گروه تفاوت معنا داری را نشان دادند ($p \leq 0.05$). همچنین افزایش تیتر آنتی بادی در گروه (MO) نسبت به گروه بدون اجوانت (O) کاملا مشخص بود و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده شد ($p \leq 0.05$). به طور کلی هر کدام از گروه ها به تنهایی با گروه کنترل منفی تفاوت معنی داری داشتند. بنابراین گروه (AO) دارای بیشترین سطح و گروه (O) دارای کمترین سطح عیار آنتی بادی بود.

چالش: نمودار کالپان مایر (شکل ۳) درصد محافظت موش ها



شکل ۳: نمودار کالپان مایر: درصد محافظت موش ها در برابر دز کشنده باکتری. مربوط به چهار گروه مورد آزمون AO (باکتری و آلوم)، گروه MO (باکتری و مونتاناید)، O (باکتری به تنهایی) و TSB (کنترل منفی).



شکل ۲: نتایج الیزا مربوط به چهار گروه مورد آزمون AO (باکتری و آلوم)، گروه MO (باکتری و مونتاناید)O (باکتری به تنهایی) و TSB (کنترل منفی).

پس از ایمن سازی در برابر دز کشنده باکتری را نشان می دهـد. تمام موش های گروه کنترل تا ۳٦ ساعت پس از چالش مردنـد. محافظت در برابر موش های گروه O تنها ٤٨ ساعت پـس از چالش ادامه یافت و پس از آن ٦٠ درصد موش ها زنده ماندند. در گروه MO تفاوت معنی داری با گروه AO نشان نداد، پـس از ٦٠ ساعت ٨٠ درصد موش ها را محافظت نمود، امـا گـروه AO توانست ١٠٠ درصد موش ها را تا پایان دوره محـافـظـت نماید.

بحث

اشریشیا کلی شایع ترین عامل اسهال باکتریایی و مرگ و میر در جهان است. امروزه تحقیقات قابل توجهی در این زمینه انـجـام گرفته است و با وجود پیشرفت های اخیر در علـم پـزشـکـی تاکنون واکسن *اشریشیا کلی* O157:H7 توسعه نیافتـه و دارای مجوز برای ایمن سازی انسان نیست. در این تحقـیـق، از روش الایزا به منظور بررسی ایمنی زایی در حیوان آزمـایـشـگـاهـی و بدست آوردن حداکثر تیتر آنتی بادی استفاده گردید و به منظور تفکیک و تشخیص ژن های مورد نظر از آزمون واکنش زنجیـره ای پلی مراز استفاده شد. در این مطالعه، پـس از جـداسـازی و شناسایی باکتری *اشریشیا کلی*، به منظور ایجاد ایمنی و بـررسـی آنتی بادی های ایجاد شده علیه باکتری در حیوان آزمایشگـاهـی موش Balb/C، باکتری با فرمالین ۰/۳ درصد غـیـرفـعـال و دو اجوانت آلوم و مونتاناید مورد استفاده قرار گرفت. اجوانت هـا سبب افزایش میزان عرضه آنتی ژن و پایداری آن مـی شـونـد (١٤). از جمله شناخته شده ترین ادجوانت ها، آلوم می بـاشـد. اجوانت آلوم توسط اداره غذا و داروی امریکا اجازه استفاده بـا واکسن های مصرف انسانی را دارد. این اجوانت در ایجاد پاسخ ایمنی ضعیف عمل می کند و به تنهایـی قـادر بـه تـقـویـت پاسخ های ایمنی هومورال است (٢١). واکسن های تهیه شده از جسم سلولی باکتری ها در القای پاسخ ایمنی چـنـدان مـوفـق نیستند، اما تجویز این نوع آنتی ژن هـمـراه بـا اجـوانـت هـا می تواند موجب تحریک بیشتر سیستم ایمنی در پاسخ دهی بـه این آنتی ژن گردد (٢٢). فیگوریدو (Figueiredo) و همـکـاران در سال ٢٠٠٤ به منظور بررسی و یافتن آنتی بادی علیه *فیمبریه F41*، از سـویـه ی *E. coli* K99 در گـاو هـای بـاردار، از اجوانت آلومینیوم و پتاسیم سولـفـیـت اسـتـفـاده کـردنـد، کـه بـاعـث افـزایـش ایـمـنـی هـومـورال در حـیـوان می شود (٢٣). نـتـایـج تـحـقـیـقـات حسـیـنـی جـزنـی (Hosseini Jazani) و همکـاران در سـال ٢٠١١ نشـان داد نالوکسان به عنوان یک اجوانت همراه با اجوانت آلـوم بـاعـث ایمنی در موش آزمایشگاهی Balb/C شد (٢٤). اجوانـت آلـوم پاسخ ایمنی هومورال را به وسیله تحریک سلول هـای Th_2 و تکثیر لنفوسیت های B افزایش می دهد. آلوم توانایی تحـریـک تولید منوسیت ها و گرانولوسیت ها را دارد و همچنین بـاعـث افزایش تمایز منوسیت ها به سلول های دندرتیک مـی گـردد. امروزه آلوم در ٨٠٪ از واکسن ها مورد استفاده قرار می گـیـرد. عمده ترین محدودیت آلوم عدم توانایی القای پـاسـخ Th_1 و پاسخ ایمنی سلولی به منظور کنترل اغلب پاتوژن هـای داخـل سـلـولـی مـانـنـد *لـیـشـمـانـیـا* مـی بـاشـد (٢٥). واکنش زنجیره ای پلیمراز ابزار تشخیصی حساس، سـریـع و نسبتا ارزان برای تشخیص ژن های عوامل بیماری زا می باشـد. بخشی (Bakhshi) و همکاران در سال ١٣٩٠ طـی طـراحـی پرایمر های اختصاصی، قادر به شناسایی کلنی های رشد یافـتـه باکتری *اشریشیا کلی* سویه O157:H7 نسبت به دیگر کلنی های رشد یافته در محیط کشت شدند. کارگر (Kargar) و همکـاران در سال ١٣٨٤ در جهرم از روش واکنش زنجیره ای پلی مـراز برای ردیابی شیگاتوکسین استفاده کردند. لـئـوتـا (Leotta) و همکاران در سال ٢٠٠٨ از این روش برای رد یابـی ژن هـای *stx1*، *stx2* و *eaxA* در آرژانتین استفاده نمودند. محققـیـن یـاد شده نشان دادند که معمول ترین سروتایپی که برای انسـان و حیوان بیماری زا است و مواد غذایی را آلوده می نمایـد، سـرو تایپ *E.coli* O157:H7 تولید کـنـنـده ژن هـای *eae*، *ehxA*، *stx1*، *stx2* می باشد (٢٦). از طرفی، رایج ترین و محبوب ترین آزمون سرولوژی که هم اکنون در دنیا به کار گرفته مـی شـود انواع آزمون الیزا است. بسیاری از فعالیت های تحقیقـاتـی کـه انجام می پذیرد نیاز به ارزیابی سرولوژی پاسخ ایمنی دارند. در

این مطالعه نیز برای بررسی پاسخ ایمنی موش های ایمن شده، با مواد موجود اقدام به طراحی و استاندارد کردن آزمون الیزای غیر مستقیم بر اساس روش کار گردید. این آزمون همانند الیزای غیر مستقیم انجام شده توسط خالصی (Khalesi) و همکاران در سال ۱۳۹۱ به منظور بررسی تیتر آنتی بادی علیه باکتری *اشریشیا کلی انتروتوکسوژنیک*، انجام شد (۲۷). نتایج این مطالعه نشان داد که نوع اجوانت استفاده شده تاثیر به سزایی در القای پاسخ ایمنی دارد و تزریق باکتری همراه با اجوانت ها سیستم ایمنی موش را بیشتر تحریک می کند و موجب افزایش عیار آنتی بادی می شود. در خصوص ادجوانت آلوم افزایش آنتی بادی از هفته دوم به بعد مشاهده شد و در هفته چهارم به حداکثر مقدار خود رسید و تا هفته ششم هم در سطح بالا باقی ماند، اما در مورد اجوانت مونتانايد از هفته دوم به بعد کاهش تیتر آنتی بادی در سرم خون موش آزمایشگاهی مشاهده شد. اما در دو هفته اول دجوانت مونتانايد عیار بالاتری را نسبت به اجوانت آلوم نشان داد، از این رو آلوم اجوانت مناسبی برای این منظور است. همان طور که قبلا اشاره شد، واکسن معرفی شده در این تحقیق می تواند در واکسیناسیون گاو و گوسفند مورد استفاده قرار گیرد. عبادی (Ebadi) و همکارانش واکسنی حاوی آنتی ژن های اصلی از سه باکتری *اشریشیاکلی* انتروتوکسیژنیک، *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک و شیگا طراحی کردند و برای بررسی ایجاد محافظت در برابر EHEC مورد آزمایش قرار دادند. در نهایت، حیوانات ایمن شده، با باکتری زنده *اشریشیا کلی* O157:H7 مورد چالش قرار گرفتند. چالش موش های ایمن شده نشان داد که آنتی ژن یادشده توانایی لازم برای محافظت موش ها در برابر این باکتری را دارد (۲۸). در این مطالعه نیز به منظور بررسی میزان ایمنی زایی واکسن های تهیه شده، موش های گروه های مختلف به وسیله باکتری زنده *اشریشیا کلی* O157:H7 به چالش کشیده شدند. نمودار ۳، درصد بقای موش های گروه های مختلف را پس از چالش با دز کشنده باکتری نشان می دهد. نتایج نشان داد که زمان بقای موش های گروه AO و MO تفاوت معنی داری با گروه کنترل دارند. گروه AO توانست صد درصد موش ها را تا پایان دوره محافظت کند و قادر به ایجاد یک حمایت نسبی علیه سویه کشنده باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 است.

نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر و مطالعات انجام شده توسط دیگر محققان حاکی از آن است که ارائه ی راه های موثر مبارزه با *اشریشیا کلی* و دیگر عوامل بیماری زای ایجاد کننده اسهال ضروری است. این تحقیق با مقایسه دو اجوانت مختلف نشان داد که راه برای ادامه تحقیق در این زمینه وجود دارد و هنوز هم نیاز به تحقیقات بیشتر احساس می شود. بنابراین بهره گیری از دیگر اجوانت ها در ارائه معیاری برای انتخاب کاندیدای واکسن در پیشگیری از بیماری اسهال و مقابله با آن مفید می باشد. واکسن معرفی شده در این تحقیق می تواند یک راهبرد جدید برای تولید واکسن علیه *E. coli* O157: H7 باشد و در واکسیناسیون گاو و گوسفند مورد استفاده قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از جناب آقای دکتر سید محمد حسین حسینی بخاطر زحمات در انجام و استاندارد سازی الایزا و مهندس صفر صادق زاده مسئول بخش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی شیراز کمال تشکر و امتنان را دارند. این پژوهش با حمایت موسسه رازی با پروژه مصوب شماره ۹۱۱۱۳-۱۸-۸۴-۲ انجام شده است.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Conway PL. Microbial ecology of the human large intestine. Human colonic bacteria; 1995.

2. Jay CM, Bhaskaran S, Rathore KS, Waghela SD. Enterotoxigenic K99+ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. Vet Microbiol. 2004; 101: 153-160.

3. Clarke SC. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* an emerging problem. Diagn Microbiol Infect Dis. 2001; 41: 93-98.

4. Heuvelink A, Bleumink B, Van den Biggelaar F, Te Giffel M, Beumer R, De Boer E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. J Food Prot. 1998; 61: 1597-1601.

5. Walker T. Microbiology. Saunders Company, Philadelphia. 1998.

6. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1989; 2: 15-38.

7. Hara-Kudo J. Flourogenic and chromogenic media, the rapid technique for isolation of V. cholera. J. Appl. And Eviron. Mic. 2003; 67: 5819-5823.

8. Schroeder CM, Cuiwei Z, Chitrita D, Jocelyn T, Shaohua Z, White DG. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(2): 576–581.

9. Salyers AA. Bacterial pathogenesis: a molecular approach, ASM press Washington. 1994.

10. Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. The CI Repressors of Shiga Toxin-Converting Prophages Are Involved in Coinfection of *Escherichia coli* Strains, Which Causes a Down Regulation in the Production of Shiga Toxin. J Bacteriol. 2008; 190(13): 4722–4735.

11. Maleki H, Salmanian AH, Amani J, Kordenaiej A, Jafari M. Production of Bivalent Protein EspA-Tir from *Escherichia coli* O157:H7 in Tobacco (*Nicotiana tobbacum*). Crop Biotech. 2013; 5: 1-9. [in Persian]

12. Lima KM, dos Santos SA, Rodrigues JM, Silva CL. Vaccine adjuvant: it makes the difference. Vaccine. 2004; 22: 2374-2379.

13. Aguilar J. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine. 2007; 25: 3752-3762.

14. MacKichan ML, O'Hagan DT, Singh M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. Biomol Eng. 2001; 18: 69-85.

15. Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. Vaccine. 2002; 20: 56-64.

16. Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández S, Regidor-Cerrillo E, Rodríguez-Bertos J, Prenafeta A, Gomez-Bautista A. Influence of adjuvant and antigen dose on protection induced by an inactivated whole vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. Vet Parasitol. 2001; 175: 220-229.

17. Doavi T, Mousavi SL, Kamali M, Amani J, Ramandi MF. Chitosan-based intranasal vaccine against *Escherichia coli* O157: H7. IBj. 2016; 20(2): 97. [in Persian]

18. Meng J., Zhao Sh, Doyle MP, Mitchell SE, Kresovich S. Polymerase chain reaction for detecting *Escherichia coli* O157:H7. Int J Food Microbiol. 1996; 32: 103-113.

19. Namdar N, Kargar M, Tahamtan Y, Hosseini MH. Antagonistic effects of bifidobacterium spp. in decrease of cytopathic effects of Verotoxin-producing *Escherichia coli*. JMW. 2013; 5: 94-104. [In Persian].

20. Tahamtan Y, Alimohamadi N. Evaluation of three dilutions of E. coli antigen in

immunogenicity in balb/c mice. Vet Res Biol. 2017; 117: 40-49. [In Persian].

21. Allison AC, Byars NE. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. Mol Immunol. 1991; 28: 279-284.

22. Hasani SH, Hosseini Jazani N, Shahabi Sh, Karamati SA. Evalution of the effect of ICI118, 155, A beta adrenoreceptor antagonsit, and allum, as adjuvantes for increasing the protection of vaccination against *Salmonella typhimurium*. Urmia medical journal. 2014; 24: 851-861. [In Persian].

23. Figueiredo H, Lage AP, Pereira Júnior FN, Leite RC. Passive immunity in cattle against enterotoxigenic *Escherichia coli*: serologic evaluation of a bacterin containing K99 and F41 fimbriae in colostrum of vaccinated females and calf serum. Arq Bras Med Vet Zootec. 2004; 56: 425-432.

24. Jazani NH, Parsania S, Sohrabpour M, Mazloomi E, Karimzad M, Shahabi Sh. Naloxone and alum synergistically augment adjuvant activities of each other in a mouse vaccine model of *Salmonella typhimurium* infection. Immunobiology. 2011; 216: 744-751.

25. Raman VS,. Reed SG, Malcolm MS, Christopher B, Matlashewski G. Adjuvants for *Leishmania vaccines*: from models to clinical application. Front Immunol. 2012; 3: 144.

26. Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina. BMC Microbiol. 2008; 8: 46.

27. Khalesi R, Salimian J, Nazarian SH, Ehsaei Z, Rahimi AA, Amini N. Production and purification of heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its detection by GM1 gangelioside receptor-ELISA based method. AMUJ. 2012; 15: 35-42. [In Persian]

28. Ebadi V, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Tarverdizadeh Y, Bakhshi M. Designing a Recombinant Vaccine containing three bacterial proteins of EHEC, ETEC, and Shigella Dysentery Antigens in *E. coli* and Evaluation of its Humoral Immunity in Mic. J Mazandaran Univ Med Sci. 2018; 27: 1 – 16. [in Persian]