ارزیابی ایمونولوژیکی OMP-F وزیکول سودوموناس آئروژینوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ به عنوان واکسن حفاظتی در مدل موش

دکتر حجت احمدی[۱*]، دکتر بهمن تبرائی[۱]، مهدی نجاتی[۱]، دکتر سیدداور سیادت[۱]، فرحناز پورمیرزاقلی[۲]

۱- بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن، مجتمع تحقیقاتی و تولیدی انستیتو پاستور ایران ۲- مؤسسه تحقیقات صنعتی بیوتکنولوژی KFG

Title: *Immunological evaluation of OMP-F vesicle of Pseudomonas aeruginosa CSBPI: 16-190 as a protective vaccine in mice model*

Authors: *Ahmadi H,(PhD); Tabaraie B,(PhD); Nejati M,(M.Sc); Siadat SD,(PhD); Pormirzagholi F(BSc).*

Introduction: *Prevention and control of Pseudomonas aeruginosa infections are still among serious nosocomial problems worldwide, since chemotherapeutic control of the infection generally fails. Therefore, using a safe and reliable vaccine against all wild Pseudomonas aeruginosa serotypes is the only solution to overcome this problem.*

Methods: *300 Pseudomonas aeruginosa strains were isolated from patients admitted to four Tehran hospitals. Using standard O-specific typing sera, they were all grouped in 16 out of 17 known Pseudomonas aeruginosa serotypes. The 16 serotypes were lyophilized and each given a code according to the Collection of Standard Bacteria of Pasteur Institute of Iran (CSBPI) for further investigation. Among all clinical samples, CSBPI: 16-190 was the most prevalent Pseudomonas aeruginosa serotype which showed a high agglutination titer against homologous O-specific typing sera. This serotype was selected for extraction of Pseudomonas aeruginosa major outer membrane vesicles (OMP-F).OMP-F vesicles were extracted and purified by deoxycholate ultracentrifuge-differentiation technique. After molecular evaluation, protective activities and safety of the OMP-F vesicles were determined in animal models.*

Results: *Preset investigation reveals that, purified OMP-F vesicles of Pseudomonas aeruginosa CSBPI: 16-190 is able to induce a high level of protection against all 16 live homologous and heterologous native Iranian Pseudomonas aeruginosa serotypes. Besides, it was pyrogen free and did not produce any detectable abnormal toxicity in rabbits, mice and guinea pigs.*

Discussion: *The results showed that purified OMP-F vesicles of Pseudomonas aeruginosa CSBPI: 16-190 can be considered a safe and protective immunogen in vaccine therapy against infections caused by all native Pseudomonas aeruginosa immunotypes in Iran.*

Keyword: *OMP-F vesicles, Pseudomonas aeruginosa, vaccine.*

Hakim 2006;9(1):38-44.

* نویسنده مسؤول: بخش واکسن‌های باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن، مجتمع تحقیقاتی و تولیدی انستیتو پاستور ایران، کیلومتر ۲۵ اتوبان تهران – کرج، تلفن: ۶۱۰۲۹۳۸-۰۲۶۱، نمابر: ۶۱۰۲۹۰۰-۰۲۶۱

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]

پست الکترونیک: hojiahmadi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: *کنترل و پیشگیری عوارض ناشی از عفونت سودوموناس آئروژینوزا یکی از معضلات عمده در عفونت‌های بیمارستانی در سراسر جهان است. زیرا دارودرمانی عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه با تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها غالباً با شکست روبرو می‌گردد. بنابراین تنها راه جلوگیری از عوارض ناشی از سودوموناس آئروژینوزا مصرف واکسن بی‌زیان و مؤثری است که بدن را علیه کلیه سروتیپ‌های مختلف بومی حفاظت نماید.*

روش کار: *از نمونه‌های بالینی جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های تهران، ۳۰۰ گونه سودوموناس آئروژینوزا ایزوله و شناسایی گردید، با استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی سماتیک (O) جملگی در ۱۶ سروتیپ از ۱۷ سروتیپ شناخته شده سودوموناس آئروژینوزا قرار گرفتند. پس از کدگذاری و تهیه کشت خالص، ۱۶ سروتیپ انتخابی لیوفلیزه شده و در کلکسیون باکتری‌های استاندارد انستیتو پاستور ایران (CSBPI) نگهداری گردیدند. سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ که یکی از شایع‌ترین سروتیپ‌های سودوموناس آئروژینوزا را تشکیل داده و بیشترین واکنش سرولوژیک را با آنتی‌سرم اختصاصی خود نشان می‌دهد، به‌عنوان مدل جهت تهیه OMP-F وزیکول لایه خارجی دیواره سلولی سودوموناس آئروژینوزا انتخاب گردید. OMP-F وزیکول به روش دزاکسی کولات-اولترا سانتریفیوژ افتراقی از غشای خارجی سروتیپ CSBPI:۱۶ -۱۹۰ استخراج شد. پس از بررسی ملکولی، فعالیت حفاظتی و بی‌زیانی آن در مدل حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.*

نتایج: *تحقیق حاضر نشان می‌دهد که OMP-F تخلیص شده از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ فعالیت حفاظتی قابل توجهی را علیه ۲×LD۵۰ از ۱۶ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا هممولگ و هترولگ زنده بومی ایران از خود نشان می‌دهد به علاوه تب‌زا نبوده و فاقد هرگونه سمیت قابل سنجش در خرگوش، موش و خوکچه هندی می‌باشد.*

بحث: *ارزیابی نتایج حاصل از تحقیق انجام شده نشان می‌دهد که OMP-F وزیکول غشای خارجی دیواره سودوموناس آئروژینوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ را می‌توان به‌عنوان ایمونوژنی مفید و مؤثر با طیف وسیع حفاظتی علیه عفونت‌های ناشی از آلودگی سروتیپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا بومی ایران به‌کار گرفت.*

گل‌واژگان: *OMP-F وزیکول، سودوموناس آئروژینوزا، واکسن.*

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب در عفونت‌های نوزوکومیالی است که همواره کنترل و پیشگیری عوارض ناشی از آن از زمره معضلات بهداشتی در سراسر جهان به‌شمار می‌رود (۱). ماهیت دوزیستی (انگلی و ساپروفیتی) سودوموناس آئروژینوزا سبب گردیده تا میزان گسترش شیوع آن در بیماران سوانح و سوختگی، مبتلایان به سیستیک فیبروزا و نئوپلاستی، افراد مبتلا به نقص سیستم‌ایمنی، کسانی که تحت عمل جراحی قرار گرفته‌اند وبیمارانی که پیوند اعضا داشته یا دستگاه‌های مصنوعی در بدن آنها کار گذاشته شده است، بسیار بالا باشد (۳-۱).

سودوموناس آئروژینوزا دارای ۱۷ سروتیپ شناخته شده است. اگر چه انتشار هر یک از طریق هوا، آب، خاک، پوست و البسه نیز امکان‌پذیر است اما انتقال فعال نوزوکومیالی آنها غالباً به علت عدم رعایت موازین بهداشت عمومی پرسنل بیمارستانی، بیماران ناقل و استفاده از تجهیزات پزشکی آلوده می‌باشد. کنترل سریع عفونت سودوموناسی به علت مصرف بی‌رویه دارو و مقاومت دارویی بالا به‌ویژه علیه آنتی‌بیوتیک‌های متداول، غالباً با شکست روبرو می‌گردد. به این جهت است که امروزه ایمونوتراپی بیماران با واکسنی بی‌زیان و مؤثر به‌منظور

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]

جلوگیری از عوارض ناشی از سودوموناس آئروژینوزا بسیار امیدبخش است (۴ و ۵).

تزریق زیرجلدی دوز مؤثری از لیپوپلی ساکارید[1] خالص و یا دتوکسیفاید، سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان ایمونوژنی فعال توسط بسیاری از محققان پیشنهاد گردیده است (۹-۶). اما ماهیت پاتوفیزیولوژیک LPS و اختصاصی بودن فعالیت‌های ایمونولوژیک سروتیپ‌های مختلف آن، مصرف LPS را جهت کنترل عفونت‌های سودوموناسی عملاً محدود نموده است (۱۰-۶). در صورتی که استفاده از پروتئین‌های عمده غشای خارجی دیواره سلولی[2] سودوموناس آئروژینوزا و سایر باکتری‌های گرم منفی نه تنها غیرسمی بوده و سیستم ایمنی بدن را فعالانه تحریک می‌نمایند، بلکه با mOMPs سایر سروتیپ‌های متعلق به یک گونه نیز واکنش ایمونولوژیک متقاطع از خود نشان می‌دهند (۱۵-۱۱).

نظر به اینکه OMP-F وزیکول با وزن ملکولی ۳۷-۳۵ کیلودالتون عمده‌ترین پروتئین غشای خارجی دیواره سلولی سودوموناس آئروژینوزا را تشکیل می‌دهد بنابراین می‌توان آن را به‌عنوان کاندیدی مفید و مؤثر در واکسینوتراپی بیماران علیه سروتیپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا به‌شمار آورد (۱۱ و۱۶ و ۱۷).

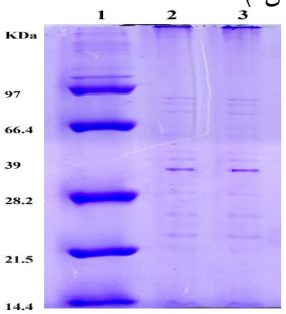
روش کار

سروتیپ باکتری و شرایط کشت: توسط محیط انتقالی کاری بلر اصلاح‌شده، ۳۰۰ نمونه بالینی سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در چهار بیمارستان امام خمینی، طالقانی، شریعتی و سوانح و سوختگی تهران جمع‌آوری گردید. پس از کشت نمونه‌ها در محیط اختصاصی سودوموناس آگار (شرکت مرک)، با استفاده از کیت کامل آنتی‌سرم‌های سماتیک (O) سودوموناس آئروژینوزا (شرکت دیفکو) مشخص شد که به استثنای سروتیپ ۱۴، جملگی در ۱۶ سروتیپ از ۱۷ سروتیپ شناخته شده سودوموناس آئروژینوزا قرار دارند. سروتیپ‌ها پس از کدگذاری و لیوفلیزاسیون سریع توسط دستگاه لیوفلیزاتور (یوزی فروید) در مرکز کلکسیون نگهداری باکتری‌های استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی انستیتو پاستور ایران به‌صورت ذخیره[3] دایمی نگهداری گردیدند.

شدت آگلوتیناسیون ml ^{8}۱۰×۹ از سلول کشته شده هر یک از سروتیپ‌ها علیه آنتی‌سرم‌های سماتیک هملوگ به روش سرولوژیک لوله مورد مقایسه قرارگرفت. سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژینوزا که با آنتی‌سرم اختصاصی خود بیشترین واکنش آگلوتیناسیون را نشان داده و یکی از شایع‌ترین سروتیپ‌ها را تشکیل می‌داد جهت استخراج OMP-F از دیواره سلولی انتخاب گردید.

تهیه بذر و شرایط کشت: از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژینوزا بذر تهیه گردید. سپس به دو گالن شیشه‌ای ۱۰ لیتری محتوی ۵ لیتر محیط کشت سنتتیک سودوموناس (۱۸)، ۵۰ میلی‌متر بذر در شرایط کاملا استریل اضافه گردید. گالن‌ها در دمای ^{oC}۱±۳۶ و دور ۱۲۰۰rpm (هم‌زن مغناطیسی) قرار گرفتند. در انتهای فاز لگاریتمی رشد (تقریباً ۱۶ ساعت) و اطمینان از پاکی کشت، توده سلولی در ۶۰۰۰×g و دمای ^{oC}۴ به مدت ۹۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و توسط PBS (pH=۷/۲) سه بار شستشو شد.

استخراج و تخلیص OMP-F: طبق روش پیشنهادی کلاسن و همکاران (۱۹۹۶)، با استفاده از دزاکسی کلات و اولتراسانتریفوژ افتراقی OMP-F استخراج و تخلیص گردید (۱۹). سپس با استفاده از روش SDS-PAGE الکتروفورز (لامیلا:۱۹۷۰) در ژل ۱۰٪ و به‌کارگیری مارکرهای استاندارد (فارماسیا) درجه خلوص و وزن ملکولی OMP-F سنجش و محاسبه گردید (شکل۱).



شکل ۱- الگوی SDS-PAGE الکتروفورز OMP-F وزیکول‌سودوموناس آئروژینوزا سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ در ژل ۱۰٪ ـ ستون ۱: مارکرهای استاندارد با وزن ملکولی پایین ـ

[1] - LPS
[2] - mOMPs
[3] - Stock

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]

ستون ۲ و ۳ به ترتیب ۲ و ۴ میکروگرم پروتئین OMP-F وزیکول

سنجش پروتئین: پروتئین OMP-F وزیکول بر اساس روش پیترسون (لوری اصلاح شده) مورد سنجش قرار گرفت (۲۰).

توان القای سنتز آنتی‌بادی هیپرایمیون در خرگوش: به یک گروه سه‌تایی از خرگوش سفید نیوزلندی با وزن ۱/۵ الی ۲ کیلوگرم، ۵۰۰ میکروگرم از OMP-F وزیکول سودوموناس آئروژینوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ به همراه ادجوانت فروند کامل به‌صورت داخل ماهیچه‌ای در روزهای ۱، ۲۸، ۵۸ و ۱۴۸ تزریق گردید. پس از یک هفته بعد از آخرین تزریق، خون هر یک از خرگوش‌ها از طریق قلب جمع‌آوری شده و آنتی‌سرم‌های OMP-F وزیکول مخلوط گردیدند. سپس واکنش رسوبی آنتی‌سرم هیپرایمیون علیه OMP-F خالص طبق روش ژل ایمونودیفیوژن اخترلونی (۲۱) در آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت.

ایمن‌سازی غیرفعال: این آزمون طبق روش گیل‌لند و همکاران (۱۹۸۴) انجام گرفت (۲۲).

ایمن‌سازی فعال علیه سروتیپ‌های همولگ و هترولگ: با استفاده از مدل حیوانی پیر و همکاران (۱۹۷۸)، توان حفاظتی فعال OMP-F وزیکول سودوموناس آئروژینوزا CSBPI:۱۶ -۱۹۰ علیه سلول‌های زنده همولگ و هترولگ مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳).

محاسبه LD۵۰: هر یک از ۱۶ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های تهران را به مدت ۱۸ ساعت در نوترینت آگار کشت داده، سلول‌ها توسط BS (pH=۷/۲) شسته شد. سپس تعلیقی معادل ۰/۲ غلظت نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر از هر یک در PBS (pH=۷/۲) تهیه گردید.

LD۵۰ هر یک از سروتیپ‌ها با تزریق دوزهای مختلفی از سلول‌های زنده به گروه سه‌تایی از موش به روش رد و مونچ (۱۹۳۸) محاسبه گردید. به‌طوری که میانگین دو برابر LD۵۰ از ۱۶ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا تقریباً معادل ۵×۱۰^{۸} سلول زنده در میلی‌لیتر بدست آمد (۷).

آزمون پیروژنی: این آزمون طبق روش پیشنهادی در گزارش فنی سازمان جهانی بهداشت (۱۹۷۳) جهت اثبات عدم وجود احتمالی عوامل تب‌زا در OMP-F وزیکول خالص انجام پذیرفت (۲۴).

آزمون ایجاد حساسیت در پوست: طبق روش کریج (۱۹۶۵)، ایجاد حساسیت آنی و یا تأخیری در پوست، با تزریق زیرجلدی ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم در ۰/۱ میلی‌لیتر PBS (pH=۷/۲) از OMP-F وزیکول و مشاهده محل تزریق به مدت ۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

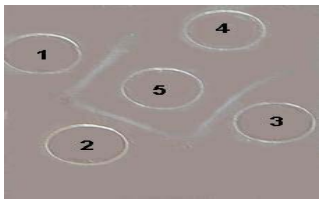
آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال: این آزمون جهت تعیین بی‌زیانی مصرف OMP-F وزیکول‌های خالص غشای خارجی دیواره سلولی در خوکچه هندی و موش انجام گردید.

نتایج

انتخاب سروتیپ مناسب سودوموناس آئروژینوزا جهت استخراج OMP-F: در تحقیق حاضر از بین ۱۶ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ که با ۱۸/۹۴ درصد ابتلا از ۳۰۰ نمونه بالینی، یکی از شایع‌ترین سروتیپ‌های پاتوژن در چهار بیمارستان تهران بوده و با آنتی‌سرم همولگ سماتیک نیز در تیتر ۳۲۰ صد درصد واکنش آگلوتیناسیون (+۴) از خود نشان داد. جهت استخراج OMP-F وزیکول غشای خارجی دیواره سلولی انتخاب گردید.

SDS-PAGE الکتروفورز OMP-F: چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌گردد الگوی حرکت الکتروفورزی OMP-F خالص شده به روش دزاکسی کلات (۱۹)، در ستون۲ و ۳ از ژل SDS-PAGE ۱۰٪ شامل یک باند در محدوده ۳۹-۳۷ کیلودالتون است که OMP-F بوده و ستون ۱ مارکرهای استاندارد با وزن ملکولی پایین است.

آزمون ایمونودیفیوژن در ژل آگارز: انتشار دوگانه OMP-F استخراج شده از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژینوزا علیه آنتی‌سرم هیپرایمیون خرگوش تهیه شده از آن، واکنش رسوبی مشخصی را در ژل آگاروز ایجاد نموده است (شکل ۲). این آزمون توان القایی OMP-F در سنتز آنتی‌بادی همولگ در بدن حیوان را نشان می‌دهد.



شکل ۲- آزمون ژل ایمونودیفیوژن: چاهک شماره ۱، ۲، و ۳ (۵۰۰µg از OMP-F خالص)، چاهک شماره ۴ (۵۰۰µg از BSA

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]

به عنوان شاهد منفی)، چاهک شماره ۵ (سرم هیپرایمیون خرگوش علیه OMP-F)

ایمن‌سازی غیرفعال: جدول ۱، توان حفاظتی تزریق ۰/۲۵ میلی‌لیتر آنتی‌سرم OMP-F وزیکول سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ را علیه ۲×LD۵۰ سلول زنده سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ که در موش‌های مورد آزمون ایجاد شده است را نشان می‌دهد؛ در صورتی که تزریق میزان مشابهی از سرم نرمال خرگوش در گروه کنترل فاقد هرگونه واکنش حفاظتی علیه ۲×LD۵۰ سلول زنده سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ می‌باشد.

جدول ۱- ایمن‌سازی غیرفعال در موش با تزریق سرم هیپرایمیون علیه ۲×LD۵۰ سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰

گروه	دوز چلنج	تعداد زنده مانده	درصد زنده مانده	P-Value
آزمایش	۲×LD۵۰	۹:۱۰	٪۹۰	۰/۰۰۱
کنترل	۲×LD۵۰	۰:۵	٪۰	۰/۰۰۱

ایمن‌سازی فعال: جدول ۲ توان حفاظتی فعال OMP-F وزیکول را علیه ۲×LD۵۰ سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ و ۱۵ سروتیپ هترولگ سودوموناس آئروژینوزا را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌گردد تزریق داخل صفاقی ۱۰ میکروگرم OMP-F وزیکول استخراج شده از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ به هر یک از موش‌های گروه اول در روزهای ۱ و ۵ قادر است ۱۰۰ درصد ایمنی حفاظتی علیه تزریق صفاقی ۲×LD۵۰ سلول زنده پس از یک هفته را ایجاد نماید. به علاوه همین میزان OMP-F وزیکول توانست بین ۵۰ الی ۱۰۰ درصد ایمنی فعال حفاظتی علیه تزریق ۲×LD۵۰ از ۱۵ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا هترولگ نیز ایجاد نماید.

در صورتی که تزریق مشابه ۰/۱ میلی‌لیتر PBS (pH=۷/۲) در روزهای ۱ و ۵ به موش‌های گروه شاهد فاقد هرگونه ایمنی حفاظتی علیه تزریق داخل صفاقی ۲×LD۵۰ سلول زنده از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ می‌باشد.

آزمون پیروژنی: جهت مشاهده عدم وجود ناخالصی بیش از حد عوامل تب‌زا در OMP-F وزیکول، آزمون پیروژنی در خرگوش طبق روش پیشنهادی در گزارش فنی سازمان جهانی بهداشت (۱۹۷۳) انجام پذیرفت (۲۴). نتایج نشان می‌دهد که تزریق داخل جلدی ۱۰۰ میکروگرم (وزن پروتئین) از OMP-F وزیکول سودوموناس آئروژینوزا به ازای یک کیلوگرم وزن خرگوش تغییری در میانگین گرمای نرمال بدن حیوان ایجاد نمی‌نماید.

آزمون ایجاد حساسیت در پوست: با توجه به نتایج حاصل از تزریق زیرجلدی ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم OMP-F وزیکول سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ به پوست خرگوش هیچ‌گونه آسیبی به‌صورت حساسیت آنی (پس از ۲ ساعت) و یا تأخیری (پس از ۷۲ ساعت) در پوست مشاهده نگردید. به علاوه تزریق مجدد ۲۵ میکروگرم OMP-F وزیکول به‌صورت داخل جلدی در محل دیگر نیز واکنش حساسیت پوستی (پدیده شوارتزمن) را به‌دنبال نداشت. در صورتی‌که با تزریق ۱×LD۵۰، ۲×LD۵۰، ۵×LD۵۰ از سلول زنده سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ صدمه‌های پوستی نسبتاً شدیدی به‌صورت سرخی، تورم و خشکی پوست پس از ۲۴ ساعت ایجاد گردید و در رقت‌های ۱۰×LD۵۰ و ۵۰×LD۵۰ سلول زنده سروتیپ فوق این ضایعات به‌صورت نکروز بافت پوستی ظاهر گشت.

جدول ۲: ایجاد ایمنی فعال در موش با تزریق OMP-F وزیکول استخراج شده از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ علیه ۲×LD۵۰ سلول زنده سروتیپ هموگ و ۱۵ سروتیپ هترولگ سودوموناس آئروژینوزا

سویه چلنج	دوز چلنج	تعداد زنده مانده	درصد زنده مانده
CSBPI:۱-۱۰۱	۳ × ۱۰۸	۵:۱۰	۵۰
CSBPI:۲-۱۶۰	۳ × ۱۰۸	۸:۱۰	۸۰
CSBPI:۳-۱۲۷	۳ × ۱۰۸	۵:۱۰	۵۰
CSBPI:۴-۸۹	۶ × ۱۰۸	۸:۱۰	۸۰
CSBPI:۵-۶۰	۶ × ۱۰۸	۱۰:۱۰	۱۰۰
CSBPI:۶-۱۰۹	۵ × ۱۰۸	۵:۱۰	۵۰
CSBPI:۷-۱۰۷	۴ × ۱۰۸	۸:۱۰	۸۰
CSBPI:۸-۹۸	۵× ۱۰۸	۷:۱۰	۷۰
CSBPI:۹-۱۰۵	۷ × ۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBPI:۱۰-۵۵	۴ × ۱۰۸	۷:۱۰	۷۰
CSBPI:۱۱-۱۰۶	۵ × ۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBPI:۱۲-۱۹۵	۳ × ۱۰۸	۱۰:۱۰	۱۰۰
CSBPI:۱۳-۱۰۸	۳ × ۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBPI:۱۵-۱۴	۵ × ۱۰۸	۶:۱۰	۶۰
CSBP1:۱۶-۱۹۰	۳ × ۱۰۸	۱۰:۱۰	۱۰۰
CSBPI:۱۷-۱۱۰	۶ × ۱۰۸	۶:۱۰	۶۰

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]

آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال: نتایج نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ میکروگرم از OMP-F وزیکول سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژینوزا به یک گروه پنج‌تایی از خوکچه هندی نه تنها مرگ‌ومیر و یا کاهش وزن نرمال را در حیوان سبب نگردیده است بلکه نظیر شاهد منفی PBS (pH=۷/۲) هیچ‌گونه ضایعه‌ای نیز در محل تزریق و یا اعضای داخلی حیوان پس از اتوپسی ایجاد نمی‌نماید و نیز تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم از OMP-F وزیکول سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس آئروژینوزا به یک گروه پنج‌تایی از موش پس از ۷۲ ساعت سبب مرگ‌ومیر و یا کاهش میانگین وزنی از موش‌ها نگردیده است.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه توان حفاظتی پروتئین‌های عمده غشای خارجی (mOMPs) دیواره سلولی بسیاری از باکتری‌های گرم‌منفی بیماری‌زا علیه عوامل اتیولوژیک مربوطه کاملاً به اثبات رسیده است (۱۵-۱۲ و ۲۶).

در این مطالعه سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ که یکی از شایع‌ترین ایمونوتیپ‌های سودوموناس آئروژینوزا بومی در بیمارستان‌های تهران بوده و بیشترین واکنش آگلوتیناسیون را با آنتی‌سرم اختصاصی O از خود نشان می‌دهد، به عنوان ایمونوژن مفید و مؤثر در مدل موش مورد ارزیابی قرار گرفته است. بنابراین محور اصلی این تحقیق بررسی ایمونولوژیکی و بی‌زیانی مصرف OMP-F وزیکول سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ علیه سروتیپ هومولگ و ۱۵ سروتیپ هترولگ سودوموناس آئروژینوزا شایع در ایران است.

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ میکروگرم OMP-F وزیکول استخراج شده از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ با وزن ملکولی ۳۷-۳۹ کیلودالتون (شکل ۱) در روزهای ۱، ۲۸، ۵۸ و ۱۴۸ قادر است سیستم ایمنی هومرال خرگوش را در القای سنتز آنتی‌کر اختصاصی به‌طور قابل توجهی تحریک نماید (شکل ۲). به‌طوری که تزریق داخل صفاقی ۰/۲۵ میلی‌لیتر از همان آنتی‌سرم هیپرایمیون خرگوش در چهار نوبت به موش، توان حفاظتی مناسبی را علیه ۲×LD۵۰ سلول زنده سودوموناس آئروژینوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ ایجاد نمود (جدول ۱).

برخلاف LPS سودوموناس آئروژینوزا که سیستم ایمنی بدن حیوان را انحصاراً علیه سروتیپ هومولگ خود تحریک می‌نماید (۲۷)، موش‌های واکسینه با ۱۰ میکروگرم OMP-F وزیکول CSBPI:۱۶-۱۹۰ مقاومت قابل توجهی را علیه ۲×LD۵۰ سلول زنده سروتیپ هومولگ و پانزده سروتیپ هترولگ سودوموناس آئروژینوزا از خود نشان دادند (جدول ۲). این یافته نشان می‌دهد که علت این واکنش متقاطع ایمونولوژیکی وجود اپی‌تیپ‌های مشترک مابین OMP-F وزیکول دیواره سلولی سروتیپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

عدم وجود ناخالصی‌های پیروژنیک احتمالی در OMP-F استخراج شده به روش انتخابی از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ نیز با انجام آزمون پیروژنی در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت، به‌طوری که تزریق زیرجلدی ۱۰۰ میکروگرم از OMP-F وزیکول به ازای یک کیلوگرم وزن خرگوش سبب افزایش دمای نرمال بدن حیوان نگردید. به علاوه در آزمون ایجاد حساسیت پوستی نیز تزریق زیرجلدی ۵، ۲۵،۵۰، ۱۰۰ و حتی ۱۵۰ میکروگرم از OMP-F وزیکول سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ فاقد هرگونه تحریک‌زایی در پوست خرگوش می‌باشد. در صورتی‌که تزریق داخل جلدی ۱×LD۵۰، ۲×LD۵۰، ۵×LD۵۰، ۱۰×LD۵۰ و ۵۰×LD۵۰، سلول کشته شده سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ عارضه شدیدی را در پوست خرگوش به‌علت وجود LPS در دیواره سلولی ایجاد نموده است.

در ادامه مطالعات حاضر، بی‌زیانی مصرف OMP-F وزیکول نیز توسط آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال در موش و خوکچه هندی مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طوری‌که از نتایج ملاحظه می‌شود، با تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم OMP-F وزیکول خالص به گروه پنج‌تایی موش و ۵۰۰ میکروگرم به گروه پنج‌تایی خوکچه هندی، هیچ‌گونه ضایعه‌ای در محل تزریق و اعضای داخلی حیوانات پس از اتوپسی ایجاد نگردید به علاوه ۷ روز بعد از تزریق، کاهش وزن و یا مرگ و میر نیز در بین حیوانات مشاهده نشد.

با ارزیابی داده‌های حاصل از تحقیق حاضر چنین می‌توان نتیجه گرفت که OMP-F وزیکول استخراج شده از سروتیپ CSBPI:۱۶-۱۹۰ سودوموناس‌آئروژینوزا توان حفاظتی قابل توجهی را نه تنها علیه عفونت ایجاد شده توسط سروتیپ هومولگ CSBPI:۱۶-۱۹۰ در موش از خود نشان می‌دهد بلکه قادر است حیوان را در مقابل عوارض ناشی از سایر ایمونوتیپ‌های دیگر سودوموناس آئروژینوزا محافظت نماید. ضمناً تزریق OMP-F وزیکول خالص شده (به روش دزاکسی‌کلات- اولترا سانتریفوژ افتراقی) کاملاً بی‌زیان می‌باشد.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]

اگرچه مصرف انسانی OMP-F وزیکول بـه عنـوان ایمونـوژنی مفید و مؤثر به تحقیقات گسترده‌تری به‌ویژه انجام آزمون‌هـای سنجش کارایی و بی‌زیانی درمدل انسانی نیازمند است اما به‌نظر می‌رسد OMP-F وزیکول دیواره سلولی سودوموناس آئروژینـوزا CSBPI:۱۶–۱۹۰ را می‌توان به عنوان کاندیدی جهـت تولیـد یـک واکـسن مفیـد و مـؤثر بـا طیـف وسـیع حفـاظتی علیـه عفونت‌های ناشی از سروتیپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا بومی ایران به‌کار برد.

References

1- Chen TY, Shang HF, Chen TL, et al. Recombinant protein composed of Pseudomonas exotoxin A, Outer Membrane Proteins I & F as vaccine against P. aeruginosa infection. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 52:524- 533.

2- Maschmeyer G, Braveny I. Review of the Incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. Eur J clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 915- 925.

3- Gang RK, Bang RL, Sanyal SC ,et al. *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in burns. Burns 1999; 25: 611-616.

4- Karimi Estahbanati H, Pour Kashani P, Ghanaatpisheh F, et al. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns 2002 ;28: 340- 348.

5- Rastegar lari A, Bahrami H, Alaghehbandan R. Pseudomonas infections in Tohid burn center, Iran. Burns 1998; 24: 637- 641.

6- Jang IJ, Kim IS, Park WJ, et al. Human immune response to a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine. Vaccine 1999;17:158-168.

7- Kim DK, Kim JJ, Kim JH, et al. Comparison two immunization schedules for a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins vaccine in burn patients. Vaccine 2001; 19: 1274-1283.

8- Alexander LW, Fisher MW. Immunization against Pseudomonas infection after thermal injury. J Infect Dis 1974; 130 (suppl): 152-158.

9- Roe EA, Jones RJ. Immunization of burned patients against *Pseudomonas aeruginosa* infection at safdarjang hospital, New Delhi. Review of Infectious Diseases. 1983; 5(Suppl.5): 5922-5930.

10- Cryz SJ, JR, Furer E, Cross AS, et al. Safety and immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* o-polysaccharide toxin. A conjugate vaccine in humans. J clin Invest 1987; 80: 51-56.

11- Von Specht BU, Lucking HC, Blum B, et al. Safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein I vaccine in human volunteers. Vaccine 1996; 14 (12): 1111-1117.

12- Tabaraie B, Sharma P, Ganguly NK, et al. Stimulation of macrophage oxygen free-radical production and lymphocyte blastogenic response By immunization with porins. Microbiol Immunol 1994; 36(7): 561-569.

13- Tabaraie B, Sharma BK, Sharma-Rishi P. Evaluation of salmonella porins as a broad spectrum vaccine candidate. Microbiol Immunol 1994; 38(7): 553-559.

14- Tabaraie B, Sharma P, Sharma BK. Evaluation of immunoprophilactic activities of purified porins of *Salmonella typhi* 0-901 and *Salmonella typhimurium* Ra-c. Vaccine 1992; 4:278-284.

15- Tabaraie B, Nejati M, Ahmadi H, et al. Comparative characterization of porins from *Salmonella typhi* 0-901 & *Salmonella typhimurium* RA-30. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran 2000; 14(2): 161-168.

16- Robert EW, Hancock and CareyAM, Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: Heat-and 2-Mercaptoethano (-modifiable proteins. J Bacteriol 1979; 902-910.

17- Gilleland HE, JR, Gielland LB, Mathews –Greer JM. Outer membrane protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strain in rats. Infect Immun 1988; 56: 1017-1022.

18- Miller JM, Spilsbury JF, Jones RJ, et al. A new polyvalent Pseudomonas vaccine. J Med Microbiol 1977;10; 19-27.

19- Classen J, Meylis J, Van der Ley P, et al. Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. Vaccine 1996;14: 1001-1008.

20- Peterson GL, A simplification of the protein assay of Lowry, et al. which is more generally applicable. Anal Biochem 1977; 83:346-356.

21- Ouctherlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Prog Allergy 1962; 6:30-154.

22- Gilleland HE Jr, Parker MG, Mathews JM, et al. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice. Infect Immun 1984;44: 49-54

23- Pier GB, Sidberry HF, Sadoff JC. Protective immunity induced in mice by immunization with high-molecular-weight polysaccharide from *pseudomonas aeruginosa*. J Clinical Investigation 1978; 69: 303-308.

24- WHO Technical Report. Series No. 530, 1973; pp: 48-52.

25- Craig JP. Preparation of The vascular permeability factor of *Vibrio cholera*. J Bacteriol 1965; 42: 793-798.

26- Calrac AM, Peeters IVO JTM. Immunogenicity of various presentation forms of Por-A outer membrane protein of *Neisseria meningitides* in mice. Vaccine 1999; 2702-2712.

27- Cryz SJJr, Furer E, Cross AS, et al. Role of Lipopolysaccharide in Virulence of *Pseudomonas aeruginosa.* Infect Immun 1984 508-513.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-04-07]