

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

دکتر حجت احمدی<sup>۱\*</sup>، دکتر بهمن تهرانی<sup>۱</sup>، مهدی نجاتی<sup>۱</sup>، دکتر سیدداور سیادت<sup>۱</sup>، فرحناز پورمیرزاقلی<sup>۲</sup>  
 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); Pormirzaghali 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: ۰۲۶۱-۶۱۰۲۹۳۸،  
 شماره: ۰۲۶۱-۶۱۰۲۹۰۰

## 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 ۱۶-۱۹۰ CSBPI 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 و زیکول لایه خارجی دیواره سلولی سودوموناس آئروژینوزا انتخاب گردید. OMP-F و زیکول به روش دزاکسی کولات-اولترا سانتیفریوژ افتراقی از غشای خارجی سروتیپ ۱۶-۱۹۰ CSBPI 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 ۱۶-۱۹۰ CSBPI فعالیت حفاظتی قابل توجهی را علیه LD<sub>50</sub>×۲ از ۱۶ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا همولگ 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 و زیکول غشای خارجی دیواره سودوموناس آئروژینوزا ۱۶-۱۹۰ CSBPI را می‌توان به‌عنوان ایمونوژنی مفید و مؤثر با طیف وسیع حفاظتی علیه عفونت‌های ناشی از آلودگی سروتیپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا بومی ایران به‌کار گرفت.

کل‌واژگان: OMP-F و زیکول، سودوموناس آئروژینوزا، واکسن.

## مقدمه

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 واکسن بی‌زیان و مؤثر به‌منظور

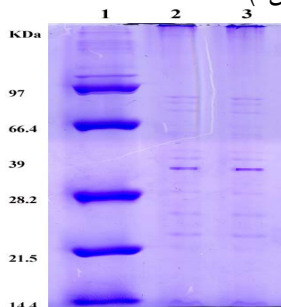
سودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع‌ترین باکتری‌های فرصت‌طلب در عفونت‌های نوزوکومیالی است که همواره کنترل و پیشگیری عوارض ناشی از آن از زمره معضلات بهداشتی در سراسر جهان به‌شمار می‌رود (۱). ماهیت دوزیستی (انگلی و ساپروفیتی) سودوموناس آئروژینوزا سبب گردیده تا میزان گسترش شیوع آن در بیماران سوانح و سوختگی،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

استاندارد بخش واکسن‌های باکتریایی انستیتو پاستور ایران به صورت ذخیره<sup>۳</sup> دائمی نگهداری گردیدند.

شدت آگلوتیناسیون ml  $9 \times 10^4$  از سلول کشته شده هر یک از سروتیپ‌ها علیه آنتی‌سرم‌های سماتیک همولگ به روش سرولوژیک لوله مورد مقایسه قرار گرفت. سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI 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 ۱۹۰-۱۶:CSBPI 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 کاملاً استریل اضافه گردید. گالن‌ها در دمای  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  و دور ۱۲۰۰rpm (هم‌زن مغناطیسی) قرار گرفتند. در انتهای فاز لگاریتمی رشد (تقریباً ۱۶ ساعت) و اطمینان از پاکی کشت، توده سلولی در  $6000 \times \text{g}$  و دمای  $4^\circ\text{C}$  به مدت ۹۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و توسط PBS (pH=7/2) 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 به کارگیری مارکرهای استاندارد (فارماسیا) درجه خلوص و وزن ملکولی OMP-F سنجش و محاسبه گردید (شکل ۱).



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

<sup>۳</sup> - Stock

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

تزریق زیرجلدی دوز مؤثری از لیپوپلی ساکراید<sup>۱</sup> خالص و یا دتوکسیفاید، سودوموناس آئروژینوزا به عنوان ایمونوژنی فعال توسط بسیاری از محققان پیشنهاد گردیده است (۹-۶). اما ماهیت پاتوفیزیولوژیکی LPS و اختصاصی بودن فعالیت‌های ایمونولوژیکی 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<sup>۲</sup> 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 ایمونولوژیکی متقاطع از خود نشان می‌دهند (۱۵-۱۱).

نظر به اینکه OMP-F وزیکول با وزن ملکولی ۳۷-۳۵ کیلو دالتون عمده‌ترین پروتئین غشای خارجی دیواره سلولی سودوموناس آئروژینوزا را تشکیل می‌دهد بنابراین می‌توان آن را به عنوان کاندیدی مفید و مؤثر در واکسینوتراپی بیماران علیه سروتیپ‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا به‌شمار آورد (۱۱ و ۱۶ و ۱۷).

## روش کار

سروتیپ باکتری و شرایط کشت: توسط محیط انتقالی کاری بلر اصلاح شده، 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

<sup>۱</sup> - LPS

<sup>۲</sup> - mOMPs

آزمون ایجاد حساسیت در پوست: طبق روش کریج (۱۹۶۵)، ایجاد حساسیت آبی 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).

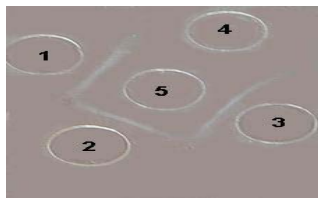
آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال: این آزمون جهت تعیین بی‌زیانی مصرف OMP-F وزیکول‌های خالص غشای خارجی دیواره سلولی در خوکچه هندی و موش انجام گردید.

### نتایج

انتخاب سروتیپ مناسب سودوموناس آئروژینوزا جهت استخراج OMP-F: در تحقیق حاضر از بین ۱۶ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا سروتیپ ۱۶-۱۹۰ CSBPI 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 تیتراژ 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 ستون ۲ و ۳ از ژل SDS-PAGE ۱۰٪ شامل یک بانده محدوده ۳۷-۳۹ 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 ۱۶-۱۹۰ CSBPI سودوموناس آئروژینوزا علیه آنتی‌سرم هیپرایمیون خرگوش تهیه شده از آن، واکنش رسوبی مشخصی را در ژل آگارز 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 (۵۰۰ μg از OMP-F خالص)، چاهک شماره ۴ (۵۰۰ μg از BSA

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 ۱۹۰-۱۶:CSBPI به همراه ادجوانت فروند کامل به صورت 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 اختزلونی (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 هتروولگ: با استفاده از مدل حیوانی پیر و همکاران (۱۹۷۸)، توان حفاظتی فعال OMP-F وزیکول سودوموناس آئروژینوزا ۱۹۰-۱۶:CSBPI علیه سلول‌های زنده همولگ و هتروولگ مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳).

محاسبه LD<sub>۵۰</sub>: 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.

LD<sub>۵۰</sub> هر یک از سروتیپ‌ها با تزریق دوزهای مختلفی از سلول‌های زنده به گروه سه‌تایی از موش به روش رد و مونچ (۱۹۳۸) محاسبه گردید. به طوری که میانگین دو برابر LD<sub>۵۰</sub> از ۱۶ سروتیپ سودوموناس آئروژینوزا تقریباً معادل ۱۰<sup>۸</sup> × ۵ 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).

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 ۱۹۰-۱۶:CSBPI 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 شوآرتزمن) را به‌دنبال نداشت. در صورتی‌که با تزریق  $LD_{50} \times 1$ ،  $LD_{50} \times 2$ ،  $LD_{50} \times 5$  از سلول زنده سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI صدمه‌های پوستی نسبتاً شدیدی به‌صورت سرخی، تورم و خشکی پوست پس از ۲۴ ساعت ایجاد گردید و در رقت‌های  $LD_{50} \times 10$  و  $LD_{50} \times 50$  سلول زنده سروتیپ فوق این ضایعات به‌صورت نکرورز بافت پوستی ظاهر گشت.

**جدول ۲: ایجاد ایمنی فعال در موش با تزریق OMP-F وزیکول استخراج شده از سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI علیه  $LD_{50} \times 2$  سلول زنده سروتیپ همولگ و ۱۵ سروتیپ هتروگ سدوموناس 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
CSBPI:۱۶-۱۹۰	۳ × ۱۰۸	۱۰:۱۰	۱۰۰
CSBPI:۱۷-۱۱۰	۶ × ۱۰۸	۶:۱۰	۶۰

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 ۱۹۰-۱۶:CSBPI را علیه  $LD_{50} \times 2$  سلول زنده سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI که در موش‌های مورد آزمون ایجاد شده است را نشان می‌دهد؛ در صورتی‌که تزریق میزان مشابهی از سرم نرمال خرگوش در گروه کنترل فاقد هرگونه واکنش حفاظتی علیه  $LD_{50} \times 2$  سلول زنده سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI می‌باشد.

**جدول ۱- ایمن‌سازی غیرفعال در موش با تزریق سرم هیپرایمیون علیه  $LD_{50} \times 2$  سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI**

گروه	دوز چلنج	تعداد زنده مانده	درصد زنده مانده	P-Value
آزمایش	$LD_{50} \times 2$	۹:۱۰	۹۰٪	۰/۰۱
کنترل	$LD_{50} \times 2$	۰:۵	۰٪	۰/۰۱

ایمن‌سازی فعال: جدول ۲ توان حفاظتی فعال OMP-F وزیکول را علیه  $LD_{50} \times 2$  سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI و ۱۵ سروتیپ هتروگ سدوموناس آئروژینوزا را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌گردد تزریق داخل صفاقی ۱۰ میکروگرم OMP-F وزیکول استخراج شده از سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI به هر یک از موش‌های گروه اول در روزهای ۱ و ۵ قادر است ۱۰۰ درصد ایمنی حفاظتی علیه تزریق صفاقی  $LD_{50} \times 2$  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  $LD_{50} \times 2$  از ۱۵ سروتیپ سدوموناس آئروژینوزا هتروگ نیز ایجاد نماید.

در صورتی‌که 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  $LD_{50} \times 2$  سلول زنده از سروتیپ ۱۹۰-۱۶:CSBPI 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 سدوموناس آئروژینوزا به ازای یک کیلوگرم وزن

می‌نماید (۲۷)، موش‌های واکنش‌دهنده با ۱۰ میکروگرم OMP-F و زی‌کول ۱۹۰-۱۶ CSBPI مقاومت قابل توجهی را علیه LD<sub>50</sub>×۲ سلول زنده سروتیپ همولگ و پانزده سروتیپ هتروگ سدوموناس آئروژینوزا از خود نشان دادند (جدول ۲). این یافته نشان می‌دهد که علت این واکنش متقاطع ایمنولوژیکی وجود اپی‌تیپ‌های مشترک مابین OMP-F و زی‌کول دیواره سلولی سروتیپ‌های مختلف سدوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

عدم وجود ناخالصی‌های پیروژنیک احتمالی در OMP-F استخراج شده به روش انتخابی از سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI نیز با انجام آزمون پیروژنی در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت، به طوری که تزریق زیرجلدی ۱۰۰ میکروگرم از OMP-F و زی‌کول 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 و زی‌کول سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI فاقد هرگونه تحریک‌زایی در پوست خرگوش می‌باشد. در صورتی که تزریق داخل جلدی LD<sub>50</sub>×۱، LD<sub>50</sub>×۲، LD<sub>50</sub>×۵، LD<sub>50</sub>×۱۰ و LD<sub>50</sub>×۵۰ سلول کشته شده سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI عارضه شدیدی را در پوست خرگوش به علت وجود LPS در دیواره سلولی ایجاد نموده است. در ادامه مطالعات حاضر، بی‌زیانی مصرف OMP-F و زی‌کول نیز توسط آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال در موش و خوکچه هندی مورد ارزیابی قرار گرفت. به طوری که از نتایج ملاحظه می‌شود، با تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میکروگرم OMP-F و زی‌کول 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 و زی‌کول استخراج شده از سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI سدوموناس آئروژینوزا توان حفاظتی قابل توجهی را نه تنها علیه عفونت ایجاد شده توسط سروتیپ همولگ ۱۹۰-۱۶ CSBPI در موش از خود نشان می‌دهد بلکه قادر است حیوان را در مقابل عوارض ناشی از سایر ایمنوتیپ‌های دیگر سدوموناس آئروژینوزا محافظت نماید. ضمناً تزریق OMP-F و زی‌کول خالص شده (به روش دزاکسی کلات- اولترا سانتریفوژ افتراقی) کاملاً بی‌زیان می‌باشد.

بهار ۸۵، دوره نهم، شماره اول

آزمون ایجاد سمیت غیرنرمال: نتایج نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ میکروگرم از OMP-F و زی‌کول سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI سدوموناس 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 و زی‌کول سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI سدوموناس 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 ۱۹۰-۱۶ CSBPI که یکی از شایع‌ترین ایمنوتیپ‌های سدوموناس آئروژینوزا بومی در بیمارستان‌های تهران بوده و بیشترین واکنش آگلوتیناسیون را با آنتی‌سرم اختصاصی O از خود نشان می‌دهد، به عنوان ایمنوتژن مفید و مؤثر در مدل موش مورد ارزیابی قرار گرفته است. بنابراین محور اصلی این تحقیق بررسی ایمنولوژیکی و بی‌زیانی مصرف OMP-F و زی‌کول سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI علیه سروتیپ همولگ و ۱۵ سروتیپ هتروگ سدوموناس آئروژینوزا شایع در ایران است.

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل صفاقی ۵۰۰ میکروگرم OMP-F و زی‌کول استخراج شده از سروتیپ ۱۹۰-۱۶ CSBPI 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). به طوری که تزریق داخل صفاقی ۰/۲۵ میلی‌لیتر از همان آنتی‌سرم هیپرایمیون خرگوش در چهار نوبت به موش، توان حفاظتی مناسبی را علیه LD<sub>50</sub>×۲ سلول زنده سدوموناس آئروژینوزا ۱۹۰-۱۶ CSBPI ایجاد نمود (جدول ۱).

برخلاف LPS سدوموناس آئروژینوزا که سیستم ایمنی بدن حیوان را انحصاراً علیه سروتیپ همولگ خود تحریک

یک واکسن مفید و مؤثر با طیف وسیع حفاظتی علیه عفونت‌های ناشی از سروتیپ‌های مختلف سودومناس آئروژینوزا بومی ایران به کار برد.

اگرچه مصرف انسانی OMP-F وزیکول به عنوان ایمونوژنی مفید و مؤثر به تحقیقات گسترده‌تری به‌ویژه انجام آزمون‌های سنجش کارایی و بی‌زیانی درمدل انسانی نیازمند است اما به‌نظر می‌رسد OMP-F وزیکول دیواره سلولی سودومناس آئروژینوزا CSBPI:۱۶-۱۹۰ را می‌توان به عنوان کاندیدی جهت تولید

## References

- 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.
- 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.
- Gang RK, Bang RL, Sanyal SC ,et al. *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in burns. *Burns* 1999; 25: 611-616.
- 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.
- Rastegar lari A, Bahrami H, Alaghehbandan R. *Pseudomonas* infections in Tohid burn center, Iran. *Burns* 1998; 24: 637- 641.
- Jang IJ, Kim IS, Park WJ, et al. Human immune response to a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine. *Vaccine* 1999;17:158-168.
- 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.
- Alexander LW, Fisher MW. Immunization against *Pseudomonas* infection after thermal injury. *J Infect Dis* 1974; 130 (suppl): 152-158.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Tabaraie B, Sharma BK, Sharma-Rishi P. Evaluation of salmonella porins as a broad spectrum vaccine candidate. *Microbiol Immunol* 1994; 38(7): 553-559.
- 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.
- 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.
- Robert EW, Hancock and CareyAM, Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: Heat-and 2-Mercaptoethano (-modifiable proteins. *J Bacteriol* 1979; 902-910.
- 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.
- Miller JM, Spilsbury JF, Jones RJ, et al. A new polyvalent *Pseudomonas* vaccine. *J Med Microbiol* 1977;10; 19-27.
- 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.
- Peterson GL, A simplification of the protein assay of Lowry, et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83:346-356.
- Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 1962; 6:30-154.
- 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
- 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.
- WHO Technical Report. Series No. 530, 1973; pp: 48-52.
- Craig JP. Preparation of The vascular permeability factor of *Vibrio cholera*. *J Bacteriol* 1965; 42: 793-798.
- 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.
- Cryz SJJr, Furer E, Cross AS, et al. Role of Lipopolysaccharide in Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1984 508-513.

