

Evaluation of Alginate-Exotoxin A Conjugated Vaccine Immunogenicity Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mouse Model

Roya Haji Ali Babaei^{1,2}, Reza Shapoori^{3*}, Masoumeh Beig⁴

1. Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
2. Ph.D Student, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
3. Biologic Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
4. Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen, and alginate is its most important factor in pathogenicity. The objective of the study is the immunogenicity evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate conjugated to exotoxin A as a vaccine candidate in mice.

Materials and Methods: The mucoid strain of *P. aeruginosa* 6494 was used to prepare alginate, and the separation of exotoxin A was done with the standard strain of PAO1. Alginate was extracted by means of sedimentation with cold ethanol, dialysis, enzymatic digestion and chromatography. To improve immunogenicity, purified antigen was coupled to exotoxin A with ADH as a spacer and EDAC as a linker. Based on confirmation tests, the resulting conjugate was devoid of specific toxicity and pyrogenic effect. Four groups of BALB/c female mice (each group was included 15 mice) were selected in the next step. The first group with the ALG, the second group with the D-ALG-ETA, and the third one with the ETA were vaccinated. The fourth group (control group) was vaccinated with normal saline. Vaccination was performed in three injectable doses with two-week intervals. Subsequently, serum samples were collected, and antibody responses were measured by the ELISA method for total IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

Results: After the second and third doses with ALG-ETA showed a significant increase in antibody titer against ALG-ETA in comparison with pure ALG. The titers of IgG2a, IgG2b, IgG, IgG1, IgG3 antibodies that produced against alginate increased in the third injection compared to the first conjugate injection, which was 2.9, 3, 5.2, 10, and 9.2, respectively.

Conclusion: These results show that ALG from *Pseudomonas aeruginosa* increases anti-alginate antibodies in conjugate form with exotoxin A and can be considered an appropriate, effective adjuvant.

Keywords: Alginate, Conjugate, Exotoxin A, ELISA, *Pseudomonas aeruginosa*

Received: 2021/08/11;

Accepted: 2021/12/30;

Published Online: 2022/01/20

Corresponding Information:

Reza Shapoori, Biologic Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

Email: dreza1357@gmail.com



Copyright © 2021. This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.



Use your device to scan and read the article online

Haji Ali Babaei R, Shapoori R, Beig M. Evaluation of Alginate-Exotoxin A Conjugated Vaccine Immunogenicity Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mouse Model. Iran J Med Microbiol. 2022; 16 (1) :1-16

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#) |

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

1 Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important pathogens for humans (1). It is an opportunistic, Gram-negative human pathogen (2), especially in nosocomial infections (3), so that the antibiotic resistance development in different parts of the hospital has created issues for its treatment (4).

This bacterium with different virulence factors causes infections of wounds, respiratory and

septicemia in the patients with burns and accidents that are associated with a high mortality rate (5, 6). Antibiotic-resistant *P. aeruginosa* infections are usually difficult to treat. This organism resistance to antimicrobial agents is increasing (7).

Alginate (ALG) is one of the most important pathogenic factors of *P. aeruginosa* in patients with cystic fibrosis, and its immune response is not

dependent on T cells (8). The ALG antigen can be conjugated to exotoxin A (ETA) to increase the production of antibodies in the body (9). ETA is a protein carrier (10) encoded by the *tox A* gene (11).

Various studies have used a variety of proteins, including pili, outer membrane proteins, and bacterial toxoids, to develop conjugated vaccines for the carbohydrate antigens.

In this study, for the first time, the immunogenicity of ALG-ETA conjugated vaccine was evaluated against *P. aeruginosa* infection, and the effect of this conjugate was investigated on the IgG antibody titer and its subclasses.

The aim of this study was to bind *P. aeruginosa* ALG to ETA covalently in order to increase the level of immunity produced by ALG and to evaluate the production of total IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 antibodies against *Pseudomonas* by ALG-ETA conjugate.

2. Materials and Methods

Pseudomonas aeruginosa 6494 mucoid strain obtained from the CF patients and PAO1 standard strain were used for the ALG and ETA isolation, respectively.

Isolation and Purification of ALG

For this purpose, mucoid strains were cultured in the selected medium containing glycerol, dextrose, L-glutamine, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, and MgSO₄.7H₂O, and incubated at 37°C for 72 h.

The resulting biomass was then centrifuged for 2 min, and the precipitate was discarded. The supernatant was mixed with 100% cold ethanol overnight and centrifuged at 2500 rpm for 30 min (12, 13).

ALG was converted to a clear solution using 0.1 M Tris buffer, pH 7.5. Then, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 mM calcium chloride (CaCl₂), and 0.0001 gr proteinase K were added and kept at 56°C water bath for 2 h and 4°C overnight. Then 100 µg/mL DNase and RNase were added and incubated at 37°C for 3 h. ALG was re-precipitated by the addition of cold ethanol. After centrifugation at 4°C, the precipitate, which was pure ALG was sterilized using a 0.22 µM filter (14).

For ALG de-polymerization, it was dissolved in 1% acetic acid and heated at 120°C for 15 min. After cooling, the solution was dialyzed three times in distilled water to remove the fatty acids. The dialyzed solution containing de-polymerized alginate (D-ALG) was mixed with ethanol and stored at 4°C overnight (14).

Preparation of ETA

To prepare ETA, the PAO1 standard strain was used. It was first incubated in Müller-Hinton Broth medium and then in TSB medium at 32°C for 24 h

on Shaker incubator. Sephacryl HRs 200 gel filtration column was used for purification. In order to detoxify ETA, 5 mL ETA was mixed with 10 mL PBS, incubated at 37°C for 4 days, dialyzed for 48 h, and sterilized using 0.32 µM filter. The toxin was converted to toxoid by heating in the presence of 0.2% formalin for 7 days at 37°C and dialyzed to remove formalin residues (12).

Measurement of Endotoxicity of D-ALG and ETA Samples by LAL Method

D-ALG and ETA samples were dissolved in distilled water at 5 mg/mL concentration and the endotoxin activity of the antigens was evaluated by the PyroMed kit according to the manufacturer's instructions (14, 15).

Conjugation of De-polymerized Alginate with Exotoxin A

For the conjugation, 0.5 M adipic acid dihydrazide, 0.5 M bicarbonate, and 5 mL distilled water was added to the de-polymerized ALG, and after 18 h, the obtained AH-ALG was dialyzed and concentrated. Then, pH was adjusted, 0.1 mg EDEC was added, and re-dialyzed (12). The tubes that contained samples of conjugates showed the most absorption at 210 and 280 nm wavelengths. They were then merged, concentrated, passed through 0.45 µM filter, and stored at -20°C (15).

Purification of D-ALG-ETA Conjugate

To purify ALG-ETA conjugate, it was passed through Sepharose CL-2B Column using gel filtration method. The light absorption of the fractions was recorded at two wavelengths of 210 and 280 nm. The tubes with the highest absorption at both wavelengths were mixed. The conjugates were concentrated by ultracentrifugation, passed through 0.45 µM filter, and stored at -20°C (16, 17).

Pyrogenic Test in Rabbits

To determine the pyrogenic effect of the prepared conjugates, rabbits were selected in groups of 3. After recording the first temperature by placing a thermometer in the anus of the animals, the subsequent temperatures were measured every 15 min for 1 h (The temperature limit was between 38°C and 39.8°C). The sample was then injected through the marginal vein of the ear and body temperature was recorded every 15 min for 3 h. The averages of recorded temperatures were considered. If the temperature rise is less than 0.5°C in each rabbit and less than 1.2°C in three rabbits, the injected substance is a pyrogen (18).

Toxicity and Sterility Tests

For this purpose, 10 µg of the conjugate samples were injected intraperitoneally to 5 mice, and weight loss and mortality were evaluated in animals. To evaluate the sterility of the conjugate samples, they were cultured at anaerobic and aerobic conditions on

thioglycolate, nutrient agar, blood agar, McConkey agar and Saburodextrose agar media, and the culture results were evaluated (19).

Immunogenicity Studies

Sixty female *BALB/c* mice (6-8 weeks old) were purchased from Razi Research Institute and divided into four groups of 15. The first, second, and third groups were vaccinated with ALG, D-ALG-ETA and ETA vaccines, respectively, each with a dose of 10 µg. The fourth group was injected with normal saline as a control group. Vaccination was performed in three doses (0.5 mL each time) intraperitoneally at two-week intervals and blood samples were taken from 5 mice in each group two weeks after each injection (20).

ELISA Test

In order to obtain the suitable serum dilutions, the cross-titration table method (checkerboard plate) was used. The response levels of total IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 antibodies against D-ALG, ETA, and D-ALG-ETA were measured by ELISA. The detoxification solution was added to the plate and incubated at 4°C overnight. After washing, blocking buffer was added to the wells (300 µL) and incubated for 1 h at room temperature (R.T.). To the first-row wells, 200 µL of serum at 1:10 dilution in PBS was added, and to the other wells, 160 µL of PBS was added. After preparing serial dilutions, the plate was incubated at R.T. for 2 h. After washing, anti-mouse antibody isotypes of goat origin were added to each well (100 µL) at a ratio of 1:1000 and the plate was incubated at room temperature R.T. for 1 h. Following washing, anti-Goat IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase were added to the wells (100 µL) at a ratio of 1:3000 in a wash buffer and incubated at R.T. for 1

h. The substrate solution was then added to each well (100 µL) and the plate was incubated at 15°C for 15 min. Finally, stop solution was added to each well (50 µL) and the amount of light absorption was measured at 450 nm wavelength with ELISA reader (21).

Statistical Analysis

By performing ELISA at three times repeat, the serum titer of each antibody was obtained and presented as mean ± standard deviation (SD). Accordingly, Tukey post-hoc test with P-value<0.01 was used to evaluate the differences in serum titers in the groups receiving different antigens compared to the control group.

3.Results

Measurement of Endotoxin Activity of De-polymerized ALG and ETA

Measuring the endotoxin activity of de-polymerized ALG by PyroMed kit showed the amount of endotoxin in D-ALG and ETA samples at 0.125 EU/mL. The experiment was repeated with the same results. Regarding the permissibility of the sample for biological use, which should be less than 5 EU/mL, the prepared antigens were used for conjugation.

ALG Conjugation with ETA

In the conjugated molecules, the light absorption peaks of the fractions at 280 and 210 nm coincided precisely, indicating the conjugation of D-ALG polysaccharide antigens to ETA. According to Figure 1, the second small peak observed at 280 and 210 nm was related to non-conjugated ETA and ALG, respectively.

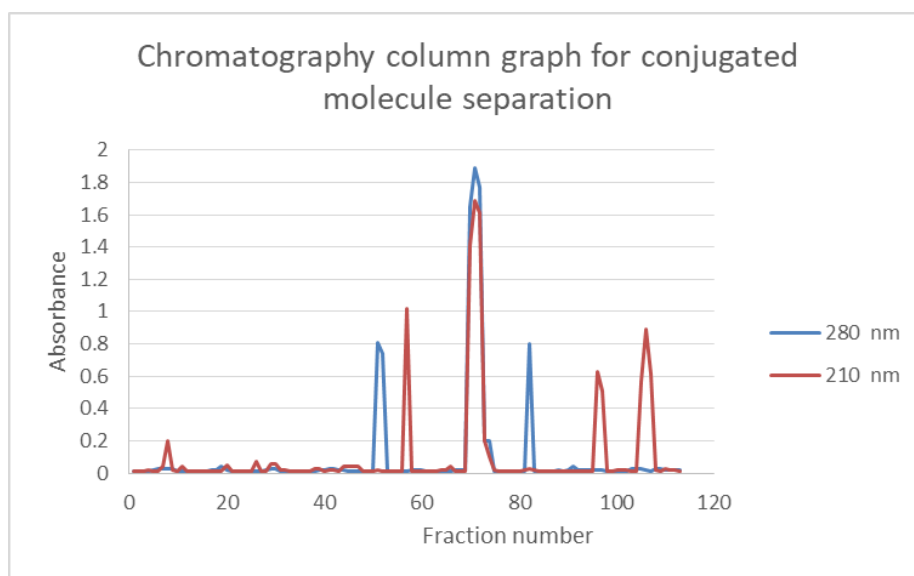


Figure 1. Sepharose CL-2B gel filtration profile of D-ALG conjugated to EXO-A. Fractions were assayed for alginate at 210 nm and 280 nm for ETA.

Pyrogenic Test Result

The prepared conjugate samples were tested for pyrogenic effects in rabbits. After 24 h the temperature rise was less than 1.4 in all three rabbits and less than 0.6 in each rabbit. Therefore, the prepared conjugates were free of pyrogen and injectable.

Toxicity and Sterility Tests Results

According to the standard method, the conjugated samples were injected into 5 mice and examined for 7 days. The absence of mortality in animals indicated that conjugates were non-toxic and injectable. On the other hand, examination of the bacterial cultures after 24 h incubation showed sterility of the samples with no growth of microorganisms.

Antibody Titers in Each Group

Examination of the antibody titers obtained at two weeks after the first injection did not show a significant increase in the IgG antibody titer against ALG. Two weeks after the second and third injections, the titers of antibodies in different groups were as follows: ALG-ETA>ALG>ETA ([Table 1](#)).

Comparison of Antibody Titers in Different Weeks After Injections

The titers of all target antibodies at two weeks after the first, second, and third injections are shown in [Figures 2 to 4](#), respectively.

Table 1. IgG serum titer against ALG at two weeks after the first, second, and third injections

		ALG-ETA	ALG	ETA	Negative control
Two weeks after the first injection	IgG	6* ± 401	7* ± 109	0.01 ± 0.1	0.03 ± 0.2
	IgG1	11* ± 120	7* ± 74	0.03 ± 0.2	0.01 ± 0.1
	IgG2a	5* ± 48	8* ± 28	0.03 ± 0.2	0.03 ± 0.1
	IgG2b	7* ± 40	11* ± 21	0.01 ± 0.1	0.01 ± 0.1
	IgG3	7* ± 119	11* ± 74	0.01 ± 0.1	0.01 ± 0.1
Two weeks after the second injection	IgG	5* ± 1303	9* ± 393	0.03 ± 0.1	0.03 ± 0.1
	IgG1	15* ± 475	8* ± 140	0.01 ± 0.1	0.03 ± 0.1
	IgG2a	8* ± 105	11* ± 160	0.05 ± 0.2	0.03 ± 0.1
	IgG2b	9* ± 89	13* ± 30	0.03 ± 0.2	0.05 ± 0.1
	IgG3	9* ± 465	13* ± 115	0.04 ± 0.2	0.05 ± 0.1
Two weeks after the third injection	IgG	8* ± 2100	11* ± 410	0.03 ± 0.3	0.05 ± 0.1
	IgG1	8* ± 1200	9* ± 191	0.01 ± 0.2	0.03 ± 0.1
	IgG2a	11* ± 140	9* ± 78	0.03 ± 0.1	0.01 ± 0.1
	IgG2b	5* ± 121	15* ± 47	0.01 ± 0.1	0.05 ± 0.1
	IgG3	5* ± 1100	15* ± 180	0.01 ± 0.1	0.05 ± 0.1

Serum titer (OD unit) (mean ± SD)

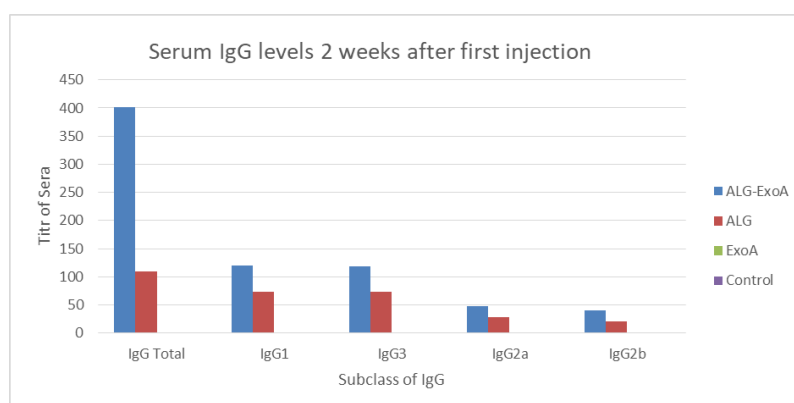


Figure 2. Induction of antibodies in BALB/c mice for two weeks after the first injection (Day 14). The results of inductions for a subclass of IgG antibodies were observed D-ALG-EXO-A> D-ALG> EXO-A

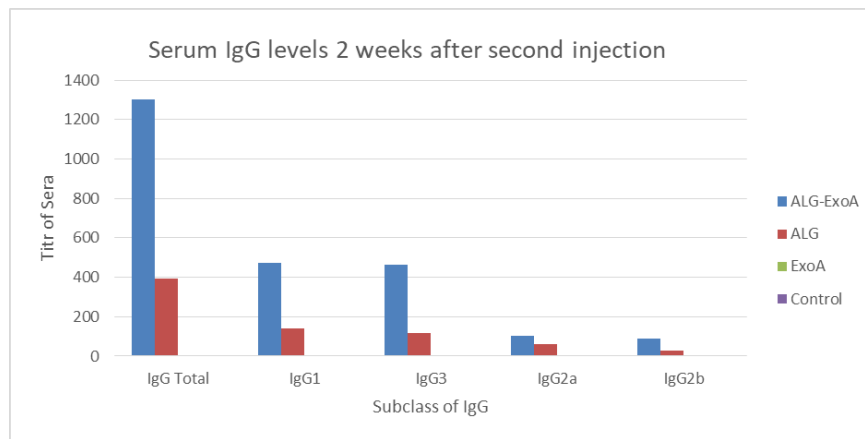


Figure 3. Induction of antibodies in BALB/c mice for two weeks after the second injection (Day 14). The results of inductions for a subclass of IgG antibodies were observed D-ALG-EXO-A> D-ALG> EXO-A

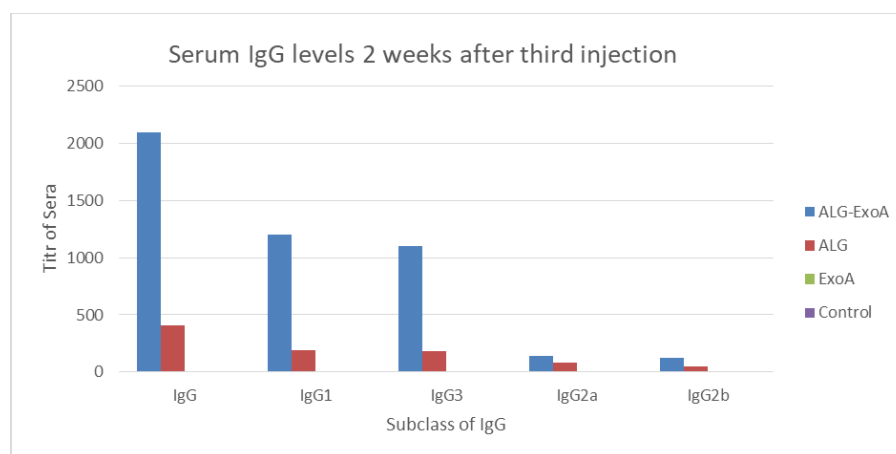


Figure 4. Induction of antibodies in BALB/c mice for two weeks after the third injection (Day 14). The results of inductions for a subclass of IgG antibodies were observed D-ALG-EXO-A> D-ALG> EXO-A

4. Discussion

Several studies have been conducted to evaluate the immunogenicity of various conjugates, including ALG-TT, ALG-SLNs, PLGA-ETA, ALG-DT, etc. In this study, for the first time, the immunogenic effect of ALG-ETA conjugate was investigated against *P. aeruginosa* infections. The effect of this conjugate on IgG antibody titer and its subclasses was also evaluated.

The ETA is one of the most important pathogenic factors of this bacterium and is produced by most of the clinical strains of *P. aeruginosa*. It has immunogenic effects and similar function to diphtheria toxin (7). ETA antibodies have protective effects against *P. aeruginosa* infections and have been used as a protein carrier in *P. aeruginosa* polyvalent vaccine candidates (21, 22).

The ETA secreted by *P. aeruginosa* is a toxic and lethal pathogenic factor that inhibits protein synthesis by the host cells. It also causes tissue changes in the

liver, apoptosis in hepatocytes, and increased expression of proinflammatory cytokines.

Research has shown that these destructive effects are counteracted by the presence of anti-ETA antibodies, and all vaccines containing ETA toxoid prevent death. Therefore, these results indicate that the use of a combination of non-toxic ETA along with other antigens in vaccines is very useful in eliciting an effective immune response (23).

Due to the advantages mentioned in this study, we conjugated ALG with ETA. In addition to being non-toxic and non-pyrogen, this conjugated vaccine can produce functional antibodies against ALG and ETA. In other words, antibodies are produced against two important pathogenic factors of this bacterium, and this will increase the immunogenicity and efficiency of the vaccine (22).

The purpose of this study was to produce a vaccine by conjugating ETA as a protein moiety to the surface

carbohydrate capsule antigen using modern methods to provide long-lasting protection against *Pseudomonas* infections.

ETA was used as a protein carrier for the polysaccharide molecule, and the ALG was used as an adjuvant to induce greater immunity compared to ETA alone so that if proven effective, these conjugates could be introduced as highly effective candidate vaccines.

All the ALG-ETA and ETA groups showed a significant difference in serum antibody titers in all three injection periods (two weeks after the first, second and third injections) compared to the control groups.

A study by Creeze *et al.* in 1997 on the ALG conjugated with tetanus toxoid (TT) protein as a protein carrier showed that more IgG antibodies were produced against conjugated ALG along with a protein carrier (24).

Also, in 2006, Kashif *et al.* co-conjugated ALG with TT. The results showed an increase in IgG titer in the conjugated form. This vaccine also helped mice survive the deadly mucoid strains of *P. aeruginosa*. One of the disadvantages of TT conjugates is that repeated usage of TT in high doses in human vaccines can over-stimulate the immune system, which can prevent the global use of TT as a protein carrier. In this study, antibodies were produced against ALG and TT (25). By replacing TT with ETA in our study, functional antibodies were produced against ALG and ETA simultaneously, which increased the effectiveness of this vaccine.

In another study by Lang *et al.* in 2004, LT-B *E. coli* toxin and *P. aeruginosa* exoprotein A (rEPA) were used as carriers (26).

In the present study, conjugated ALG immunization was higher than pure ALG, the same as Lang's study. So that, the titer of IgG antibody produced against ALG in the third injection was increased by 5.2 times compared to the first injection of the conjugate.

According to similar studies, ALG-ETA conjugate of *P. aeruginosa* produces the best antibody titer against polysaccharides (16, 21, 27, 28).

Consistent with the results of this study, Afshari and colleagues used SLN (solid lipid nanoparticles) to enhance the immunization of ALG. In this study, the titers of all antibodies against ALG-SLNs conjugate were 6% higher than mice tested with ALG alone (29). The highest antibody titer was related to IgG. In this study, the titer of IgG antibodies against ALG-ETA conjugate was higher than ALG alone, and the titer of IgG antibodies increased against ALG.

In 2015, Najafzadeh *et al.* evaluated conjugated lipopolysaccharide-diphtheria toxin and ALG-diphtheria toxin vaccines. In this study, D-LPS and D-ALG were

covalently linked to DT as a protein carrier by amidation. The results showed that the IgG antibody of mice immunized with D-LPS-DT conjugate was 4 times higher than that of mice vaccinated with D-LPS alone. Their results also showed that the conjugated vaccine based on D-ALG *P. aeruginosa* and DT had a greater increase in antibody titer than D-LPS-DT. This indicates that ALG provides better immunization.

We also used ALG in our study. Comparing the results of D-ALG-DT and D-ALG-ETA conjugate vaccines shows that D-ALG-ETA causes a further increase in the titer of anti-ALG antibodies. So that, after the third injection dose, the IgG titer increased slightly above 1800 in D-ALG-DT conjugate and to 2100 in D-ALG-ETA conjugate. Therefore, it can be concluded that as a protein carrier that is part of bacteria, ETA can act better in the immunization compared with diphtheria toxin (30).

In the present study, by adding a protein compound to the polysaccharide fraction, the titers of antibodies IgG2a, IgG2b, IgG, IgG1, and IgG3 produced against ALG increased by 2.9, 3, 5.2, 10, and 9.2, respectively.

In a 2019 study, Safari Zanjani *et al.* evaluated the immunogenicity of ETA conjugated with PLGA nanoparticles as a vaccine candidate in *P. aeruginosa*. Based on the results, ETA-PLGA could increase IgG responses to ETA antigen in the immunized mice as a suitable immunogen (9).

In the present study, the titer of IgG antibody and its subclasses also showed a significant increase after the third injection dose in the vaccinated groups with ALG-ETA compared to the vaccinated group with pure ALG. Among different protein carriers, only diphtheria and tetanus toxoid carriers have succeeded in obtaining a vaccine license (31).

5. Conclusion

Our findings showed that antitoxin A antibodies can play a greater protective effect than *P. aeruginosa* infections. This conjugated compound increases the level of anti-ALG IgG antibodies, and immunization with this type of conjugate can stimulate toxin A-neutralizing antibodies. This ALG-based conjugated vaccine is non-toxic, with no pyrogenic effect, producing functional antibodies against ALG and ETA. Another feature of this conjugate is the stability and activation of the antigenic structure. Regarding the effectiveness of these vaccines in research, it can be suggested that the resulting conjugated vaccines be introduced as a suitable candidate vaccine against *Pseudomonas* diseases. The study also found that ETA could act as a protein carrier in conjugated vaccines with good stability.

Various studies on the immunogenicity of ETA have all shown that antibodies produced against ETA can prevent death. Thus, these results suggest that using a combination of non-toxic ETA with other antigens in vaccines is very useful in eliciting an effective immune response.

Acknowledgment

None

Reference

- Luscher A, Simonin J, Falconnet L, Valot B, Hocquet D, Chanson M, et al. Combined Bacteriophage and Antibiotic Treatment Prevents *Pseudomonas aeruginosa* Infection of Wild Type and cfr-Epithelial Cells. *Front Microbiol.* 2020;11:1947. [DOI:10.3389/fmicb.2020.01947] [PMID] [PMCID]
- Ghods Zadeh M, Moradi Bidhendi S, Ashrafi F. Comparative Study of Garlic Extract Effect on the Expression of Genes Involved in Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and the Antibiotic Tobramycin. *Iran J Med Microbiol.* 2021;15(1):107-20. [DOI:10.30699/ijmm.15.1.107]
- Hoseinpoor Mohammad Abadi Z, Mokhtari A, Ebrahimi Kahrizsangi A. Evaluation of the Effect of a Number of Commercial Disinfectants on *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Human Infection Cases. *Iran J Med Microbiol.* 2020;14(2):138-53. [DOI:10.30699/ijmm.14.2.138]
- Beig M, Arabestani MR. Investigation of MexAB-OprM efflux pump gene expression in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* isolated from Intensive Care Unit. *Iran J Med Microbiol.* 2019;13(2):142-50. [DOI:10.30699/ijmm.13.2.142]
- Law N, Logan C, Yung G, Furr CL, Lehman SM, Morales S, et al. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Infection.* 2019;47(4):665-8. [DOI:10.1007/s15010-019-01319-0] [PMID]
- Howlin RP, Cathie K, Hall-Stoodley L, Cornelius V, Duignan C, Allan RN, et al. Low-Dose Nitric Oxide as Targeted Anti-biofilm Adjunctive Therapy to Treat Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. *Mol Ther.* 2017;25(9):2104-16. [DOI:10.1016/j.ymthe.2017.06.021] [PMID] [PMCID]
- Dehghan D, Fasihi-Ramandi M, Taheri R. Investigation of Synergism of Silver Nanoparticle and Erythromycin Inhibition and Detection of Exotoxin-A Gene in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Wounds Secretion. *Iran J Med Microbiol.* 2020;14(4):379-87. [DOI:10.30699/ijmm.14.4.379]
- Pournajaf A, Razavi S, Irajian G, Ardebili A, Erfani Y, Solgi S, et al. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infez Med.* 2018;26(3):226-36.
- 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 J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(6):94. [DOI:10.1007/s11274-019-2669-y] [PMID]
- Dieffenbach M, Pastan I. Mechanisms of Resistance to Immunotoxins Containing *Pseudomonas* Exotoxin A in Cancer Therapy. *Biomolecules.* 2020;10(7):979. [DOI:10.3390/biom10070979] [PMID] [PMCID]
- Mokhtari K, Amini K. Identification of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human and animal samples by multiplex-PCR and their antibiotic resistance pattern. *Iran J Med Microbiol.* 2019;13(4):294-301. [DOI:10.30699/ijmm.13.4.294]
- 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. *Biol J Microorganism.* 2018;7 (26):11-27.
- Farjah A, Owlia P, Siadat SD, Mousavi SF, Ardestani MS, Mohammadpour HK. Immunological evaluation of an alginate-based conjugate as a vaccine candidate against *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS.* 2015;123 (2):175-83. [DOI:10.1111/apm.12337] [PMID]
- Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najar-Peerayen S, Mousavi-Hosseini K, Moazeni M, Rezvan H, et al. Preliminary investigation on the isolation of alginate produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann microbiol.* 2005;55(4):279-82.

Funding

This article is an independent study conducted with no organizational financial support.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.

15. Abdi-Ali A, Khani-Juy Abad F, Gharavi S. Antibiofilm activities of certain biocides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*. 2009;1(4):23-7.
16. Canh Do G, Lin F-y, Thiem Vu D, Trach Dang D, Trong Nguyen D, Mao Nguyen D, et al. Effect of Dosage on Immunogenicity of a Vi Conjugate Vaccine Injected Twice into 2- to 5-Year-Old Vietnamese Children. *Infect Immun*. 2004;72(11):6586-8. [PMID] [PMCID] [DOI:10.1128/IAI.72.11.6586-6588.2004]
17. Faezi S, Bahrmand AR, Mahdavi M, Siadat SD, Sardari S, Nikokar I, et al. Preparation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-flagellin immunoconjugate. *Biologicals*. 2017;47:11-7. [DOI:10.1016/j.biologicals.2017.04.001] [PMID]
18. Kluger MJ, Vaughn LK. Fever and survival in rabbits infected with *Pasteurella multocida*. *J Physiol*. 1978;282(1):243-51. [PMCID] [DOI:10.1113/jphysiol.1978.sp012460] [PMID]
19. Nieman DC. Exercise immunology: practical applications. *Int J Sports Med*. 1997;18 Suppl 1(S1):S91-100. [DOI:10.1055/s-2007-972705] [PMID]
20. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun*. 2003;71(7):3875-84. [DOI:10.1128/IAI.71.7.3875-3884.2003] [PMID] [PMCID]
21. Lin FYC, Ho VA, Khiem HB, Trach DD, Bay PV, Thanh TC, et al. The Efficacy of a *Salmonella typhi* Vi Conjugate Vaccine in Two-to-Five-Year-Old Children. *N Engl J Med*. 2001;344 (17):1263-9. [DOI:10.1056/NEJM200104263441701] [PMID]
22. 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*. *J Adv Microbiol*. 2016;6(4):332-42. [DOI:10.4236/aim.2016.64032]
23. Tanomand A, Najar Peerayeh S, Farajnia S, Majidi J. Protective Properties of Nontoxic Recombinant Exotoxin A (Domain I-II) Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Iran J Biotechnol*. 2013;11(3):193-98. [DOI:10.5812/ijb.10149]
24. Cryz SJ, Lang A, Rudeberg A, Wedgwood J, Que JU, Furer E, et al. Immunization of cystic fibrosis patients with a *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. *Behring Inst Mitt*. 1997(98):345-9.
25. Kashef N, Behzadian-Nejad Q, Najar-Peerayeh S, Mousavi-Hosseini K, Moazzeni M, Djavid GE. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. *J Med Microbiol*. 2006;55(10):1441-6. [DOI:10.1099/jmm.0.46696-0] [PMID]
26. Lang AB, Rudeberg A, Schöni MH, Que JU, Furer E, Schaad UB. Vaccination of Cystic Fibrosis Patients Against *Pseudomonas aeruginosa* Reduces the Proportion of Patients Infected and Delays Time to Infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(6). [PMID] [DOI:10.1097/01.inf.0000129688.50588.ac]
27. Burns DL, Kossaczka Z, Lin Feng-Ying C, Ho Vô A, Thuy Nguyen Thi T, Bay Phan V, et al. Safety and Immunogenicity of Vi Conjugate Vaccines for Typhoid Fever in Adults, Teenagers, and 2- to 4-Year-Old Children in Vietnam. *Infect Immun*. 1999;67(11):5806-10. [PMID] [DOI:10.1128/IAI.67.11.5806-5810.1999]
28. Lanh MN, Van Bay P, Ho VA, Thanh TC, Lin FYC, Bryla DA, et al. Persistent Efficacy of Vi Conjugate Vaccine against Typhoid Fever in Young Children. *N Eng J Med*. 2003;349(14):1390-1. [DOI:10.1056/NEJM200310023491423] [PMID]
29. Afshari H, Maleki M, Hakimian M, Tanha RA, Salouti M. Immunogenicity evaluating of the SLNs-alginate conjugate against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immun Methods*. 2021;488:112938. [DOI:10.1016/j.jim.2020.112938] [PMID]
30. Najafzadeh F, Shapouri R, Rahnema M, Rokhsartalab Azar S, Kianmehr A. *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 Lipopolysaccharide-Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine: Preparation, Characterization and Immunogenicity. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(6):e17712-e. [DOI:10.5812/jjm.8(5)2015.17712]
31. Winstanley C, Coulson MA, Wepner B, Morgan JAW, Hart CA. Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol*. 1996;142(8):2145-51. [DOI:10.1099/13500872-142-8-2145] [PMID]



بررسی اثر ایمنی‌زایی واکسن کونزوگه آلژینات-اگزوتوکسین A علیه عفونت سودوموناس آئروژینوزا در مدل موش

رویا حاجی علی بابائی^{۱،۲}، رضا شاپوری^{۳*}، معصومه بیگ^۴

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبی شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۲. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
۴. دکتری میکروبی شناسی پزشکی، گروه میکروبی شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سودوموناس آئروژینوزا پاتوژنی فرصت طلب بوده و آلژینات از مهم‌ترین شاخص‌های بیماری‌زایی آن است. هدف این مطالعه بررسی ایمنی‌زایی کونزوگه آلژینات سودوموناس آئروژینوزا با اگزوتوکسین A به‌عنوان کاندیدای واکسن در موش است.

مواد و روش کار: برای تهیه آلژینات از سویه موکونیدی سودوموناس آئروژینوزا ۶۴۹۴ و سویه استاندارد PAOI برای جداسازی اگزوتوکسین A استفاده شد. آلژینات به‌وسیله رسوب دادن با اتانول سرد، دیالیز، هضم آنزیمی و کروماتوگرافی استخراج و برای افزایش ایمنی‌زایی، آنتی‌ژن به اگزوتوکسین A از ADH به‌عنوان فاصله‌گذار و EDAC به‌عنوان لینکر استفاده گردید. تست‌های تأییدی مشخص کرد که کونزوگه حاصل فاقد سمیت مشخص و تب‌زایی بود. چهار گروه موش BALB/c ماده (هر گروه شامل ۱۵ موش) انتخاب شدند که گروه اول با ALG، گروه دوم با D-ALG-ETA، گروه سوم با ETA و گروه چهارم، به‌عنوان گروه شاهد با نرمال سالین واکسینه شدند.

واکسیناسیون با سه دوز تزریقی با فواصل دو هفته‌ای انجام و پاسخ‌های آنتی‌بادی با روش الیزا برای IgG، تام، IgG3، IgG1، IgG2a، IgG2b در نمونه‌های سرمی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: پس از دومین و سومین تزریق، با ALG-ETA افزایش چشم‌گیری در میزان تیتر آنتی‌بادی‌ها بر علیه ALG-ETA در مقایسه با ALG خالص نشان دادند. در تزریق سوم نسبت به تزریق اول کونزوگه، تیتر آنتی‌بادی‌های IgG2a، IgG3، IgG1، IgG، IgG2b، علیه آلژینات به ترتیب ۹/۲، ۱۰، ۵/۲، ۳۰ و ۲/۹ برابر افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که ALG سودوموناس آئروژینوزا آنتی‌بادی‌های ضد ALG را در فرم کونزوگه با اگزوتوکسین A افزایش داده و می‌تواند یک ادجوانت مناسب به شمار بیاید.

کلید واژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، آلژینات، اگزوتوکسین A، کونزوگاسیون، الیزا

کپی‌رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰
پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۹
انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰
موضوع: باکتری شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

رضا شاپوری، مرکز تحقیقات بیولوژی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

ایمیل:

drreza1357@gmail.com

مقدمه

این باکتری با داشتن فاکتورهای ویروالانس متعدد باعث ایجاد عفونت‌های زخم، تنفسی و سپتی سمی در بیماران دچار سوختگی و تصادفی می‌گردد که می‌تواند با مرگ و میر بالایی همراه باشد (۵، ۶)، زیرا عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک معمولاً سخت درمان می‌شوند و مقاومت این ارگانیسم نسبت به عوامل ضد میکروبی در حال افزایش است (۷).

سودوموناس آئروژینوزا مهم‌ترین گونه بیماری‌زا برای انسان محسوب می‌شود (۱) و یک پاتوژن انسانی فرصت طلب، گرم منفی (۲) و مهم در عفونت‌های بیمارستانی است (۳) به طوری که بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بخش‌های مختلف بیمارستان مشکلات زیادی را برای درمان آن ایجاد کرده است (۴).

یک لوله جمع‌آوری شد. آلژینات خالص با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد (۱۴).

برای دپلمیریزاسیون آلژینات، آن را در اسید استیک ۱٪ حل نموده و در دمای 120°C به مدت ۱۵ دقیقه حرارت‌دهی، پس از سرد شدن، محلول را در برابر آب مقطر سه بار دیالیز نموده و اسیدهای چرب آزاد شده به این ترتیب حذف شدند. محلول دیالیز شده که حاوی آلژینات دپلمیریزه (D-Alg) بود با اتانول مخلوط و یک شبانه روز در دمای 4°C نگهداری شد (۱۴).

تهیه ETA

برای تهیه ETA از سویه استاندارد PAO1 استفاده شد که در ابتدا در محیط مولر هینتون براث و سپس در محیط سنتتیک TSBD در دمای 32°C به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور شیکردار قرار گرفت. از ستون ژل فیلتراسیون سفاکریل HRs200 برای خالص سازی استفاده شد. به منظور دتوکسیفیه نمودن ETA، ۵ میلی‌لیتر از ETA با ۱۰ میلی‌لیتر PBS مخلوط و در 37°C به مدت ۴ روز انکوبه گردید و برای ۴۸ ساعت دیالیز و با استفاده از فیلتر ۰/۳۲ میکرون استریل گردید. جهت تبدیل توکسین به توکسوئید، گرماگذاری در حضور فرمالین ۰/۲٪ به مدت ۷ روز در دمای 37°C انجام و از دیالیز برای خارج‌سازی بقایایی فرمالین استفاده شد (۱۲).

روش‌های آنالیزی

اندازه‌گیری میزان اندوتوکسیسیته نمونه‌های D-ALG و

ETA با روش LAL

نمونه‌های تهیه شده‌ی D-ALG و ETA در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر حل و میزان فعالیت اندوتوکسینی آنتی‌ژن‌های تهیه شده توسط کیت PyroMed مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده بررسی شد (۱۴، ۱۵).

کونژوگاسیون نمونه‌ی آلژینات دپلمیریزه با

اگزوتوکسین A

جهت کونژوگاسیون، به آلژینات دپلمیریزه شده، ۰/۵ مولار آدیپیک اسید دی‌هیدرازاید، ۰/۵ مولار بی‌کربنات و ۵ سی‌سی آب مقطر اضافه و پس از ۱۸ ساعت، AH-ALG حاصل، در برابر آب مقطر توسط کیسه‌های دیالیزی، دیالیز و سپس تغلیظ گردید و بعد از تنظیم pH ۰/۱ میلی‌گرم EDEC اضافه گردید و مجدداً دیالیز شد (۱۲). لوله‌هایی که بیشترین جذب را در طول موج‌های

آلژینات از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس محسوب می‌شود و پاسخ ایمنی نسبت به آن وابسته به سلول T ناست (۸). برای افزایش تولید آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن ALG در بدن می‌توان آن را با اگزوتوکسین A (ETA) کونژوگه کرد (۹). اگزوتوکسین A یک حامل پروتئینی بوده (۱۰) که توسط ژن toxA کد می‌شود (۱۱). در مطالعات مختلف، از پروتئین‌های متنوعی از جمله پپلی، پروتئین‌های غشاء خارجی و توکسوئیدهای باکتری‌ها برای تهیه واکسن‌های کونژوگه برای آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی استفاده کرده‌اند، با این حال در این مطالعه برای اولین بار اثر ایمنی‌زایی واکسن کونژوگه‌ی ALG-ETA علیه عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا و تاثیر این کونژوگه بر روی تیتراژ آنتی‌بادی IgG و زیر کلاس‌های آن مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این مطالعه اتصال کووالانسی آلژینات سودوموناس آئروژینوزا به ETA به منظور بالا بردن سطح ایمنی ایجاد شده توسط آلژینات و بررسی میزان تولید آنتی‌بادی‌های total IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ضد سودوموناس توسط کونژوگه ALG-ETA است.

مواد و روش‌ها

برای تهیه آلژینات از سویه موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا 6494 حاصل از بیماران CF و سویه استاندارد PAO1 برای جداسازی ETA استفاده شد.

استخراج و تخلیص آلژینات

برای این منظور سویه‌های موکوئیدی در محیط انتخابی حاوی گلیسرول، دکستروز، ال-گلوتامین، Na_2HPO_4 ، K_2HPO_4 و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ کشت داده و در دمای 37°C به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس بیوماس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب به دست آمده را دور ریخته سپس مایع رویی با اتانول سرد ۱۰۰٪ مخلوط و پس از یک شبانه روز با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۲، ۱۳). آلژینات توسط بافر تریس ۰/۱ مولار با pH: ۷/۵ به محلولی شفاف تبدیل و سپس ۰/۵٪ سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم (CaCl_2) و ۱g ۰/۰۰۰ پروتئیناز K افزوده و برای ۲ ساعت در بن ماری 56°C و یک شب در 4°C نگهداری و سپس ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر DNase و RNase افزوده و برای ۳ ساعت در 37°C انکوبه شد. آلژینات با افزودن اتانول سرد مجدداً رسوب داده شد و در دمای 4°C نگهداری و پس از سانتریفیوژ، رسوب در

داخل صفاقی با فواصل دو هفته‌ای انجام گرفت و خون‌گیری دو هفته بعد از هر تزریق ۵ عدد از موش‌های هر گروه صورت گرفت (۲۰).

آزمایش الایزا

به منظور به دست آوردن رقت‌های مناسب سرمی از روش جدول متقاطع تیتراسیون (پلیت چکر بورد) استفاده شد. سطح پاسخ آنتی‌بادی‌های IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 و IgG تام در برابر D-ALG, ETA, DALG-ETA به روش الایزا اندازه‌گیری شد. نمونه محلول دتوکسیفیه به پلیت الایزار افزوده و یک شبانه روز در دمای ۴°C انکوبه شد. پس از شستشو، ۳۰۰ میکرو لیتر بافر بلوکه کننده به چاهک‌ها افزوده و ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. به چاهک‌های ردیف اول، ۲۰۰ میکرو لیتر سرم با رقت ۱:۱۰ در PBS اضافه کرده و به سایر چاهک‌ها ۱۶۰ میکرو لیتر بافر PBS افزودیم. پس از انجام رقت سازی پلیت برای ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه و پس از انجام شستشو ایزوتایپ‌های Anti mouse antibody با منشا بزی به نسبت ۱:۱۰۰۰ به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک افزوده شده و پلیت برای ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از انجام شستشو آنتی‌بادی‌های Anti Goat IgG کونژوگه با آنزیم هورس رادیش پراکسیداز با رقت ۱:۳۰۰۰ در بافر شستشو به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهک‌ها اضافه شده و ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. محلول سوپسترا به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک اضافه و پلیت برای ۱۵ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شد. به هر چاهک ۵۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده اضافه و میزان جذب نوری پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید (۲۱).

آزمون‌های آماری

با انجام تست الایزا به صورت سه بار تکرار، تیتراژ سرمی مربوط به هر کدام از آنتی‌بادی‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار ارائه شد. بر این اساس از آزمون آماری Tukey با $P\text{-value} < 0.01$ برای بررسی اختلاف تیتراژهای سرمی گروه‌های دریافت کننده آنتی‌ژن‌های مختلف در مقایسه با گروه کنترل استفاده شد.

یافته‌ها

اندازه‌گیری میزان فعالیت اندوتوکسینی آلژینات

دپلیمریزه و ETA

۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر داشتند شامل نمونه‌های حاوی کونژوگه‌های بودند که باهم ادغام شدند و سپس تغلیظ و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شده و در دمای منفی ۲۰°C نگهداری شدند (۱۵).

تخلیص کونژوگه D-ALG با ETA

برای تخلیص کونژوگه ALG-ETA، از ستون سفارز CL-2B به روش ژل فیلتراسیون عبور داده و جذب نوری فرکشن‌ها در دو طول موج ۲۱۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. لوله‌هایی که بیشترین جذب را در هر دو طول موج داشتند با هم ادغام شدند. کونژوگه‌های تهیه شده با کمک اولتراسانتریفوژ، تغلیظ و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور و در دمای منفی ۲۰°C نگهداری شد (۱۶، ۱۷).

آزمون تب‌زایی در خرگوش

برای تعیین تب‌زایی کونژوگه‌های تهیه شده، خرگوش‌هایی در گروه‌های ۳ تایی انتخاب و پس از ثبت اولین دما با قرار دادن دماسنج در مقعد حیوان، به مدت یک ساعت هر ۱۵ دقیقه دماهای بعدی اندازه‌گیری شد (دمای به دست آمده نباید کمتر از ۳۸°C و بیشتر از ۳۹/۸°C باشد). سپس از طریق ورید مارژینال گوش، نمونه را تزریق و برای ۳ ساعت هر ۱۵ دقیقه یک بار دمای بدن ثبت شد. میانگین دماهای ثبت شده در نظر گرفته شد. چنانچه افزایش دما در هر خرگوش از ۰/۵°C و در سه خرگوش از ۱/۲°C کمتر باشد، ماده‌ی تزریقی آپیروژن است (۱۸).

آزمون توکسیسیته و آزمون استریلیتی

برای این منظور، به صورت داخل صفاقی ۱۰ میکروگرم به ۵ موش تزریق و کاهش وزن و مرگ و میر در حیوانات بررسی شد. برای بررسی استریلیتی نمونه کونژوگه‌ها، بر روی محیط‌های تایوگلیکولات، نوترینت آگار، بلاد آگار، مک کانکی آگار و سابورو دکستروز آگار، در شرایط بی‌هوازی و هوازی کشت و نتایج کشت بررسی شد (۱۹).

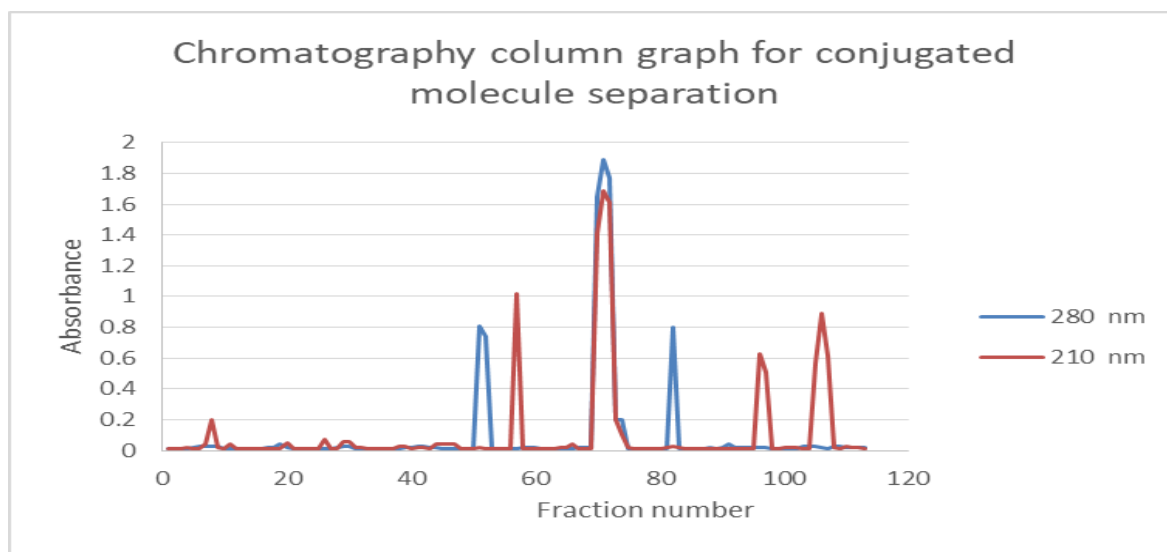
بررسی ایمنی زایی

۶۰ عدد موش نژاد BALB/c (۶ الی ۸ هفته‌ای) ماده از موسسه تحقیقاتی رازی خریداری و به چهار گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند که گروه اول با واکسن ALG و گروه دوم با واکسن D-ALG-ETA و گروه سوم با واکسن ETA هر کدام با دوزی معادل ۱۰ میکروگرم و گروه چهارم هم به‌عنوان گروه شاهد با نرمال سالین واکسینه شدند. واکسیناسیون به صورت سه دوز (هر بار ۰/۵ سی‌سی) به صورت

در مولکول‌های کونژوگه قله‌های جذب نوری فرکشن‌ها در دو طول موج ۲۸۰ و ۲۱۰ نانومتر دقیقاً روی هم منطبق بود و این مورد نشان دهنده‌ی کونژوگه شدن آنتی‌ژن‌های پلی ساکاریدی D-ALG به ETA بود. مطابق با شکل ۱ قله کوچک دوم مورد مشاهده در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۱۰ نانومتر به ترتیب مربوط به ETA و D-ALG غیر کونژوگه است.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت اندوتوکسینی آلژینات دپلمریزه، توسط کیت PyroMed، میزان آندوتوکسین موجود در نمونه‌ی D-ALG و ETA، ۰/۱۲۵ EU/mL محاسبه شد. پس از تکرار آزمایش، با توجه به مجاز بودن نمونه برای مصارف زیستی که باید کمتر از ۵ EU/mL باشد، آنتی‌ژن‌های تهیه شده برای کونژوگاسیون استفاده شدند.

کونژوگاسیون آلژینات با ETA



شکل ۱. نمودار حاصل از ستون کروماتوگرافی برای جداسازی مولکول کونژوگه

تیتر آنتی‌بادی‌های IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, Total IgG به دست آمده برای هر کدام از گروه‌ها
بررسی تیترهای به دست آمده دو هفته بعد از اولین دوز تزریق، افزایش چشم‌گیری در تیتر آنتی‌بادی IgG علیه آلژینات نشان نداد. دو هفته پس از تزریق‌های دوم و سوم ترتیب تیتر آنتی‌بادی‌های تولیدشده در گروه‌های مختلف به ترتیب ALG-ETA > ALG > ETA بود (جدول ۱).

مقایسه تیترهای آنتی‌بادی‌های مختلف دو هفته بعد از تزریق‌های اول، دوم و سوم
در شکل‌های شماره ۲ تا ۴ به ترتیب تیتر تمامی آنتی‌بادی‌های مورد آزمایش دو هفته بعد از تزریق‌های اول، دوم و سوم نمایش داده شده است.

آزمون تب‌زایی در خرگوش

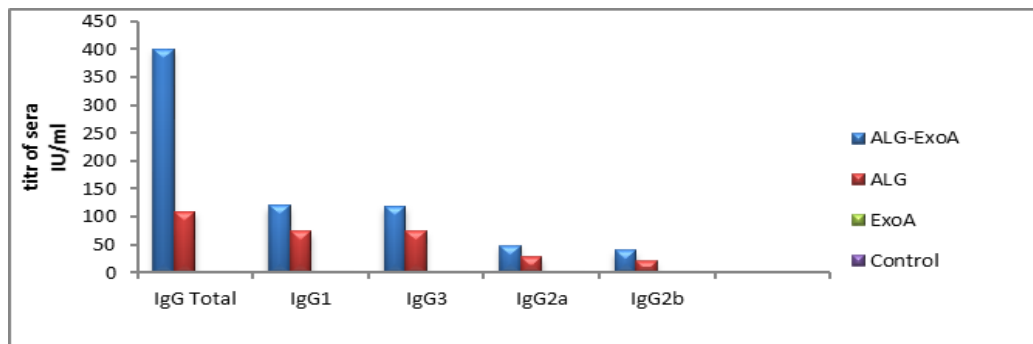
نمونه کونژوگه‌های تهیه شده تحت آزمون تب‌زایی در خرگوش قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت افزایش درجه‌ی حرارت در هر سه خرگوش کمتر از ۱/۴ و در هر خرگوش کمتر از ۰/۶ بود. لذا کونژوگه‌های تهیه شده عاری از ماده تب‌زا و قابل تزریق بودند.

آزمون توکسیسیته و استریلیتی

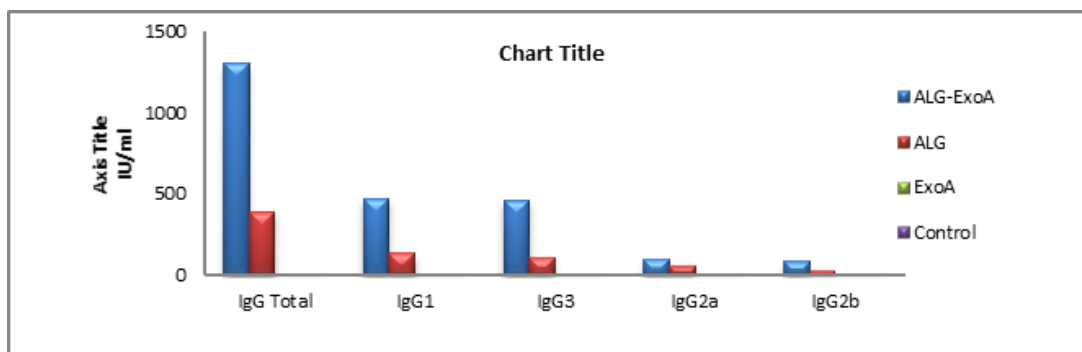
طبق روش استاندارد نمونه کونژوگه‌های تهیه شده به ۵ موش تزریق و به مدت ۷ روز تحت بررسی قرار گرفتند. عدم مشاهده‌ی مرگ و میر در حیوانات نشان دهنده‌ی غیر سمی و قابل تزریق بودن کونژوگه‌ها بود. از طرفی بررسی کشت‌های باکتریایی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، حاکی از عدم رشد میکروارگانیسم‌ها و استریل بودن نمونه‌ها بود.

جدول ۱. میزان تیتر سرمی IgG تولید شده علیه ALG برای دو هفته پس از تزریق های اول، دوم، سوم

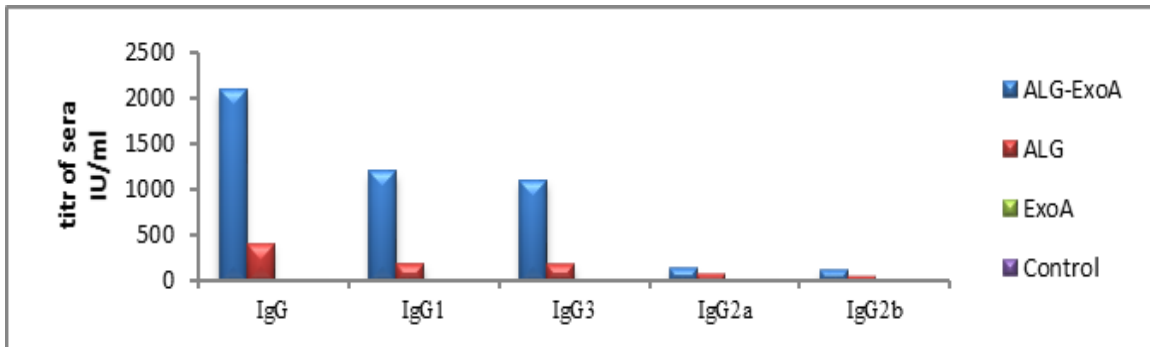
		ALG-ETA	ALG	ETA	Neg.control	
تیتر سرمی (OD unit) (mean±SD)	اولین تزریق بعد از دو هفته	IgG	۴۰۱±۶*	۱۰۹*±۷	۰/۱±۰/۰۱	۰/۲±۰/۰۳
		IgG1	*±۱۲۰ ۱۱	۷۴*±۷	۰/۲±۰/۰۳	۰/۱±۰/۰۱
		IgG2a	۴۸±۵*	۲۸*±۸	۰/۲±۰/۰۳	۰/۱±۰/۰۳
		IgG2b	۴۰*±۷	۲۱*±۱۱	۰/۱±۰/۰۱	۰/۱±۰/۰۱
		IgG3	۷*±۱۱۹	۱۱*±۷۴	۱±۰/۰۱	۱±۰/۰۱
	دومین تزریق بعد از دو هفته	IgG	۵*±۱۳۰۳	۳۹۳*±۹	۰/۱±۰/۰۳	۰/۱±۰/۰۳
		IgG1	۱۵*±۴۷۵	۱۴۰*±۸	۰/۱±۰/۰۱	۰/۱±۰/۰۳
		IgG2a	۸*±۱۰۵	۱۶۰*±۱۱	۰/۲±۰/۰۵	۰/۱±۰/۰۳
		IgG2b	۹*±۸۹	۳۰*±۱۳	۰/۲±۰/۰۳	۰/۱±۰/۰۵
		IgG3	۹*±۴۶۳	۱۳*±۱۱۵	۰/۰۴±۰/۰۲	۰/۰۵±۰/۱
	سومین تزریق بعد از دو هفته	IgG	۸*±۲۱۰۰	۴۱۰*±۱۱	۰/۳±۰/۰۳	۰/۱±۰/۰۵
		IgG1	۱۲۰۰*±۸	۱۹۱*±۹	۰/۲±۰/۰۱	۰/۱±۰/۰۳
		IgG2a	۱۴۰*±۱۱	۷۸*±۹	۰/۱±۰/۰۳	۰/۱±۰/۰۱
		IgG2b	۱۲۱/۵*±۵	۴۷*±۱۵	۰/۱±۰/۰۱	۰/۱±۰/۰۵
		IgG3	۱۱۰۰*±۵	۱۵*±۱۸۰	۰/۰۱±۰/۰۱	۰/۰۵±۰/۱



شکل ۲. میزان تیتر سرمی آنتی بادی های تولید شده علیه آلژینات برای دو هفته پس از تزریق اول



شکل ۳. میزان تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آلژینات برای دو هفته پس از تزریق دوم



شکل ۴. میزان تیتر سرمی آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آلژینات برای دو هفته پس از تزریق سوم

بحث

علاوه بر اینکه غیرسمی و غیرتبخا است، توانایی تولید آنتی‌بادی‌های عملکردی علیه آلژینات و اگزوتوکسین A را با هم دارد. به عبارتی دیگر علیه دو فاکتور مهم بیماری‌زایی این باکتری آنتی‌بادی تولید می‌شود و این باعث افزایش ایمنی‌زایی و کارایی واکسن خواهد شد (۲۲).

هدف از این مطالعه تولید واکسن با کونژوگه کردن ETA به‌عنوان بخش پروتئینی به آنتی‌ژن کپسولی کربوهیدراتی سطحی با روش‌های مدرن است که به موجب آن حفاظت پایدار و طولانی در برابر عفونت‌های سودوموناسی ایجاد گردد. استفاده از ETA به‌عنوان پروتئین حامل برای مولکول پلی‌ساکاریدی و استفاده از خواص ادجوانتی آلژینات برای القاء ایمنی بیشتر نسبت به ETA بود تا در صورت اثبات کارایی بتوان این کونژوگه‌ها را به‌عنوان یک واکسن کاندید با کارآرایی بالا معرفی کرد. تمامی گروه‌های دریافت‌کننده ETA-ALG و ETA نسبت به گروه‌های کنترل، در هر سه دوره تزریقی (دو هفته بعد از تزریق اول، دوم و سوم) از لحاظ میزان تیتر آنتی‌بادی سرمی اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۷ به‌وسیله Cryz و همکاران روی کونژوگه آلژینات با پروتئین TT به‌عنوان پروتئین حامل انجام شد، نشان داد که آنتی‌بادی IgG بیشتری علیه آلژینات کونژوگه با یک حامل پروتئینی تولید می‌شود (۲۴).

همچنین در سال ۲۰۰۶ Kashef و همکاران آلژینات را با توکسوئید تتانی (TT) کونژوگه نمودند. نتایج افزایش تیتر IgG در فرم کونژوگه را نشان داد همچنین این فرم واکسنی توانست باعث زنده ماندن موش‌ها در برابر سویه‌های موکوئیدی کشنده

مطالعات مختلفی برای بررسی اثر ایمنی‌زایی کونژوگه‌های مختلف از جمله ALG-PLGA-ETA، ALG-SLN، ALG-TT غیره انجام شده است. در این مطالعه برای اولین بار اثر ایمنی‌زایی کونژوگه ALG-ETA علیه عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا و تاثیر این کونژوگه روی تیتر آنتی‌بادی IgG و زیر کلاس‌های آن مورد بررسی قرار گرفت. اگزوتوکسین A از مهم‌ترین فاکتورهای پاتوژن این باکتری است و توسط اکثر سویه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شود و دارای اثرات ایمنونوزنی بوده و عملکردی مشابه توکسین دیفتری دارد (۷). آنتی‌بادی‌های ضد توکسین A اثر محافظت‌کنندگی موثری علیه عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا دارند و به‌عنوان حامل پروتئینی در کاندید واکسن‌های چند ظرفیتی سودوموناس آئروژینوزا استفاده شده است (۲۱، ۲۲). اگزوتوکسین A ترشح شده توسط سودوموناس آئروژینوزا یک عامل بیماری‌زای سمی و کشنده بوده که مانع سنتز پروتئین توسط سلول‌های میزبان می‌شود، همچنین باعث تغییرات بافتی در کبد و آپوپتوز سلول‌های کبدی شده و از طرفی دیگر بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی را نیز افزایش می‌دهد. تحقیقات نشان داده است که این اثرات مخرب در حضور آنتی‌بادی‌های ضد اگزوتوکسین A خنثی می‌شوند و تمام واکسن‌هایی که دارای توکسوئید اگزوتوکسین A هستند از مرگ و میر موش‌ها جلوگیری می‌کنند. بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از ترکیب اگزوتوکسین A غیر سمی با سایر آنتی‌ژن‌ها در واکسن‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی موثر بسیار مفید واقع می‌شود (۲۳). با توجه به مزایایی عنوان شده در این مطالعه آلژینات را با اگزوتوکسین A کونژوگه نمودیم. به‌طوری‌که این واکسن کونژوگه

نتایج واکنش کونژوگه D-ALG-DT با D-ALG-Exo A نشان می‌دهد که D-ALG-Exo A باعث افزایش بیشتری در تیتراژ آنتی-بادی‌های ضد آلزینات می‌شود به طوری که بعد از سومین دوز تزریق تیتراژ IgG در کونژوگه D-ALG-DT کمی بیشتر از ۱۸۰۰ و در کونژوگه D-ALG-Exo A به ۲۱۰۰ افزایش یافت پس می‌توان نتیجه گرفت که Exo A به عنوان 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 تیتراژ آنتی‌بادی‌ها IgG2a, IgG2b, IgG, IgG1, IgG3 در ترتیب ۲/۹، ۹/۲، ۵/۲، ۳/۱۰، افزایش یافت. در مطالعه‌های Safari Zanjani و همکاران در سال ۲۰۱۹ به ارزیابی ایمنی‌زایی ETA کونژوگه شده با نانوذرات PLGA به عنوان یک کاندید واکسنی در سودوموناس *آئروژینوزا* پرداختند. بر اساس نتایج، ETA-PLGA می‌تواند به عنوان یک ایمونوژن مناسب، پاسخ‌های IgG را در موش‌های ایمن شده نسبت به آنتی‌ژن ETA افزایش دهد (۹). در مطالعه حاضر نیز تیتراژ آنتی‌بادی IgG و زیرکلاس‌های آن بعد از سومین دوز تزریقی در گروه‌های واکسینه با ALG-ETA افزایش قابل توجهی 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 (۳۱).

نتیجه‌گیری

یافته‌ها و مطالعات نشان داد که آنتی‌بادی‌های آنتی‌توکسین A می‌توانند اثر محافظتی بیشتری را نسبت به عفونت‌های سودوموناس *آئروژینوزا* ایجاد نمایند. این ترکیب کونژوگه سطح آنتی‌بادی‌های IgG ضد آلزینات را افزایش داده و ایمن‌سازی با این نوع کونژوگه می‌تواند سبب تحریک آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده توکسین A شود. این واکسن کونژوگه بر مبنای آلزینات، غیر سمی بوده و قدرت تب‌زایی ندارد و می‌تواند سبب تولید آنتی‌بادی‌های عملکردی علیه آلزینات و ETA شود. از دیگر ویژگی‌های این کونژوگه پایداری ساختار آنتی‌ژنیک و فعال بودن است. با توجه به موثر بودن این واکسن‌ها در تحقیقات انجام شده می‌توان اظهار داشت که واکسن‌های کونژوگه حاصل به عنوان یک واکسن کاندید مناسب علیه بیماری‌های سودوموناس می‌تواند معرفی گردد. در این مطالعه همچنین مشخص گردید که ETA می‌تواند به عنوان پروتئین حامل در واکسن‌های کونژوگه عمل کرده و کونژوگاسیون

سودوموناس *آئروژینوزا* شود. یکی از معایب کونژوگه‌هایی TT این است که استفاده مکرر از TT در دوزهای بالا در واکنش‌های انسانی می‌تواند باعث تحریک بیش از حد سیستم ایمنی شود و همین مورد می‌تواند مانع استفاده جهانی از TT به عنوان حامل پروتئینی گردد. در این مطالعه آنتی‌بادی‌ها علیه آلزینات و TT تولید شد که ما با جایگزین کردن Exo A با TT سبب تولید آنتی‌بادی‌های عملکردی علیه آلزینات و Exo A به طور همزمان شدیم که این امر سبب افزایش کارآرایی این واکسن گردید (۲۵).

مطالعه‌ی دیگری که به وسیله Lang و همکاران در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، از توکسین *E. coli* LT-B و آگزوپروتئین A سودوموناس *آئروژینوزا* (rEPA) به عنوان حامل استفاده شد (۲۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز ایمنی‌زایی آلزینات به صورت کونژوگه همانند مطالعه‌ی انجام شده توسط لانگ، بالاتر از آلزینات خالص بود به طوری که در تزریق سوم نسبت به تزریق اول کونژوگه، تیتراژ آنتی‌بادی IgG تولیدشده علیه آلزینات ۵/۲، افزایش یافت. مطابق با تحقیقات مشابه انجام شده کونژوگه ALG-ETA سودوموناس *آئروژینوزا* بهترین تیتراژ آنتی‌بادی را بر علیه پلی‌ساکاریدها ایجاد می‌کند (۱۶، ۲۱، ۲۷، ۲۸). همسو با نتایج این مطالعه، Afshari و همکاران به منظور بالا بردن ایمنی‌زایی آلزینات، از SLN (نانوذرات جامد لیپیدی) استفاده کردند. در این بررسی تیتراژ آنتی‌بادی‌ها علیه کونژوگه‌ی ALG-SLNs نسبت به موش‌هایی که فقط با آلزینات تست شده بودند ۶ درصد بالاتر بود (۲۹). بیشترین تیتراژ آنتی‌بادی مربوط به IgG بود. در این مطالعه نیز با کونژوگه کردن آلزینات تیتراژ آنتی‌بادی‌های کلاس IgG علیه کونژوگه ALG-ETA بیشتر از آلزینات تنها بود و تیتراژ آنتی‌بادی‌های IgG تولیدشده علیه آلزینات افزایش یافت. Najafzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۵ واکسن‌های کونژوگه‌ی لیپوپلی ساکارید-توکسین دیفتری و آلزینات-توکسین دیفتری را مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه D-LPS و D-ALG با پیوند کووالان با روش آمیداسیون به DT به عنوان یک حامل پروتئینی، متصل شدند. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی IgG موش‌های ایمن شده با کونژوگه D-LPS-DT نسبت به موش‌هایی که فقط با D-LPS واکسینه شده بودند، ۴ برابر افزایش داشت همچنین نتایج آنها نشان داد که واکسن کونژوگه بر اساس D-ALG سودوموناس *آئروژینوزا* و DT نسبت D-LPS-DT باعث افزایش بیشتر در تیتراژ آنتی‌بادی‌ها می‌شود این نشان می‌دهد که آلزینات ایمنی‌زایی بهتری ایجاد می‌کند. ما نیز در بررسی خود از آلزینات استفاده کردیم از طرف دیگر مقایسه

به صورت پایدار صورت می‌گیرد. در مطالعات گوناگونی که روی ایمنی‌زایی اگزوتوکسین A صورت گرفته همگی نشان داده است که آنتی‌بادی‌هایی که علیه اگزوتوکسین A تولید می‌شود می‌توانند از مرگ و میر موش‌ها جلوگیری نمایند، بنابراین این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از ترکیب اگزوتوکسین A غیر سمی با سایر آنتی‌ژن‌ها در واکسن‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی موثر بسیار مفید واقع می‌شود.

سپاسگزاری

وجود ندارد.

تعارض در منافع

در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچگونه تضاد منافی نداشته‌اند.

منابع مالی

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است.