DOI: 10.22034/vj.2017.107240.1188
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی سه رقت آنتی‌ژن *E. coli* در ایمنی‌زایی موش‌های نژاد Balb/C

• **یحیی تهمتن (نوسنده مسئول)**
بخش میکروب شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی- شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
• **نازیلا علیمحمدی**
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، ایران
تاریخ دریافت: ۳۰-۰۵-۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۱۳-۱۱-۱۳۹۵
Email: yahyatahamtan@yahoo.com

چکیده

ای-کولی انتروتوکسیژنیک (ETEC) شایع‌ترین عامل اسهال باکتریایی و مرگ و میر درگوساله‌ها است. به علت مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مطالعه بر روی واکسن به عنوان مهم‌ترین راه پیشگیری از این بیماری مورد توجه است. سه رقت آنتی‌ژن ای-کولی K۹۹ به منظور ایمنی‌زایی آن در موش‌های نژاد balb/C مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری کشت شده با فرمالین غیر فعال و دو بار با PBS شسته شد. رسوب حاصل طبق استاندارد مک فارلند در سه غلظت $۳×۱۰^{۱۳}$ و $۳،۱۰^{۱۱}×۱۰^{۷}$ × ۳ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر به ترتیب در گروه‌های اول، دوم و سوم تنظیم گردید. سه گروه ۱۰ تایی موش به عنوان گروه مورد آزمایش دو دز تزریق به فاصله دو هفته به صورت زیر پوستی دریافت نمودند. به گروه ۱۰ تایی کنترل نیز تمام محتویات بجز جرم باکتری به همین روش تزریق شد. خون‌گیری ازموش‌ها به مدت ده هفته ادامه یافت و عیار آنتی‌بادی با روش الایزا تعیین شد. تیترسرمی درگروه‌های آزمایش از هفته چهارم تا هشتم افزایش و سپس بتدریج کاهش داشت. در حالی‌که تفاوت در گروه دوم و سوم مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$)، اما بین گروه‌های اول و دوم، و اول و سوم افزایش تیتر ملاحظه گردید ($p > ۰/۰۵$). اگرچه این ایمنی‌زایی ممکن است اختصاصی نباشد اما کامل است، یعنی برعلیه هر کدام از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن باکتری آنتی‌بادی تولید شده است. زمانی‌که جایگاه‌های سلول‌های ایمنی توسط اپی توپ‌های آنتی‌ژن پر و سپس اشباع شود، افزایش بیش از حد غلظت آنتی‌ژن تاثیر چندانی بر میزان ایمنی‌زایی ندارد.

کلمات کلیدی: آنتی ژن *E. coli* K۹۹، ایمنی‌زایی، موش، الایزا

Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 40-49

Evaluation of three dilutions of *E. coli* antigen in immunogenicity in balb/c mice

By: Tahamtan, Y., (Corresponding Author) Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. and Alimohamadi, N., Department of Biology, Facoulty of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

Received: 2016-08-20 **Accepted: 2017-02-01**

Email: yahyatahamtan@yahoo.com

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli*) (ETEC) is the common cause of bacterial diarrhea and mortality in calves. Due to antibiotic resistant, study on vaccination as the main prevention method is important. In current study, three dilutions of *E. coli* K99 antigen were evaluated for immunization of balb/C mice. Bacterial culture was inactivated by formaldehyde and washed twice by sterile PBS. Sedimentation products were adjusted in three dilutions of 3×10^7, 3×10^{11} and 3×10^{13} CUF/m1 due to McFarland standard tubes. Three groups each consisting of 10 mice were set as experimental groups which received two subcutaneous injections doses of different concentrations with two weeks intervals. The control groups (10) received placebo. Mice blood samples were collected during 10 weeks and antibody titer was evaluated by Elisa. Serum titers in all three experimental groups increased from 4th to 8th week and then decreased gradually. No differences were observed between groups two and three, but differences were observed between groups one and two, and one and three. Immunization by whole cell antigen was not specific but was complete. On the other hand; immunization was carried out against each antigenic epitope. When the immune cells sites are occupied by antigenic epitopes and then saturated, excessive concentration of antigen does not have much impact on the immunogenicity.

Keywords: *E. coli* K99 antigen, Immunization, Mice, Elisa

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های عمده بهداشتی در قرن حاضر، هنوز هم عفونت‌های اسهالی از نگرانی‌های بزرگ مجامع بهداشتی در سراسر جهان محسوب می‌شود. بیماری‌های حاصل از ابتلا به این عفونت‌ها، سالانه سبب مرگ و میر تقریبا سه میلیون نفر در سراسر جهان می‌شود. باکتری اشریشیا کلی (ای-کولی) انتروتوکسیژنیك (ETEC) شایع‌ترین عامل اسهال باکتریایی در سراسر دنیا گزارش شده است (۲۴). این بیماری‌ها همچنین از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار در صنعت دامپروری می‌باشد که باعث خسارات اقتصادی زیادی می‌شوند. از جمله این بیماری‌ها اسهال گوساله‌ها است که از دو طریق مرگ و میر گوساله‌ها و هزینه درمان و کاهش رشد دام پس از بیماری، خسارت به بار می‌آورد (۱۷). بنابراین اقدامات پیشگیرانه به منظور کاهش تلفات در طی ماه‌های اولیه مهم و ضروری است. باکتری ای-کولی باسیل گرم منفی، متحرک و بی‌هوازی اختیاری از خانواده انتروباکتریاسه است و قادر به تخمیر گلوکز و لاکتوز می‌باشد(۱۲).

به طور کلی ای-کولی‌های اسهال‌زا به پنج گروه تقسیم می‌شوند که بر اساس خصوصیت ویرولانس، مکانیسم بیماریزایی و علائم کلینیکی در اکثر موارد به سروگروه و سروتیپ‌های خاصی تعلق می‌گیرند (۲۰): انتروهموراژیک (EHEC): یکی از عوامل اسهال‌های ناشی از مواد غذایی در کشور های توسعه یافته است. انتراوینویسیو (EIEC): سویه‌های آن از نظر خصوصیات ظاهری و بیماری‌زایی شباهت زیادی به شیگلا دارند و باعث ایجاد اسهال شبه شیگلایی می‌شوند. انترواگریگیتیو (EAggEC): این سویه دومین عامل ایجاد اسهال مسافران پس از ETEC است. این سویه توکسین شبیه به توکسین مقاوم در برابر حرارت (ST) و یك همولیزین تولید می‌کند(۲۰). انتروتوکسیژنیک (ETEC): عامل اسهال کودکان و اسهال مسافران در کشورهای در حال توسعه است. همچنین عامل بروز اسهال آبکی در گوساله‌های تازه متولد شده است (۳).

از میان ای-کولی‌های انتروتوکسیژن اسهال‌زا ای-کولی K۹۹ در گوساله‌های تازه متولد شده از اهمیت خاصی برخوردار است. در اصل تاریخچه ای-کولی انتروتوکسیژنیك به سال ۱۹۵۶ در کلکته باز می‌گردد. در آن زمان دی و همکارانش باکتری اشریشیا کلی را از بالغین و کودکان مبتلا به اسهالی شبیه وبا جدا کرده و نشان دادند که این باکتری همانند وبا باعث تجمع مایعات در روده خرگوش می‌شود، اما آن‌ها این مایع را از نظر وجود انتروتوکسین مورد بررسی قرار ندادند (۱۳). فاکتورهای حدت K۹۹ ای-کولی شامل فیمبریه K۹۹ (F۵) و توکسین‌های مقاوم حرارتی (ST) و توکسین حساس به حرارت (LT) که توسط پلاسمید کد می‌شود، می‌باشد. پروتئین اتصالی فیمبری K۹۹ باعث چسبیدن باکتری به سطوح مخاطی روده کوچک می‌شود (۲۰).

این باکتری‌ها بدون تغییر شکل در اپیتلیوم روده کوچک به آن چسبیده و با تولید توکسین‌های روده‌ای (Entrotoxins) در عملکرد انتروسیت‌ها تداخل کرده و باعث افزایش ترشح، کاهش جذب و بروز اسهال می‌شوند. بنابراین مهم‌ترین فاکتورهای مرتبط با بیماری‌زایی در

ETEC فیمبریه به عنوان عامل چسبنده و انتروتوکسین‌های ترشحی می‌باشد (۱۷). چسبیدن محکم باکتری به مخاط همراه با کاهش اثرات حرکات پریستالتیک روده موجب تسهیل در استقرار باکتری می‌گردد. سپس دستگاه گوارش با بار میکروبی بالا با سویه بیماری‌زا مواجه می‌شود و با ترشح مایعات و الکترولیت به داخل روده و اسهال شدید، به سرعت موجب دهیدراته شدن، ضعف و مرگ حیوان می‌گردد (۱۴).

جهت مقابله با این بیماری از آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود اما علاوه بر هزینه‌های سنگین و همچنین ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی معمولا این روش کار ساز نیست. لذا پیشگیری از عمل انتروتوکسین با استفاده از واکسیناسیون مورد توجه محققین قرار گرفته است و به عنوان مهم‌ترین راه پیشگیری از این بیماری شناخته شده است. به دلیل مرگ و میر بالای حیوانات در اثر اسهال تلاش برای یک واکسن بی‌خطر و موثر برای محافظت در برابر اسهال ضرورت دارد. جهت تهیه آنتی‌ژن معمولا از رقت‌های بالا مانند $A\times 10^{11}$ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر و در برخی موارد رقت‌های پائین تر $A\times 10^{7}$ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر بکار می رود. در مطالعه حاضر از هر دو رقت و همچنین یک رقت حد وسط استفاده گردید. برای نیل به این هدف بررسی اثر باکتری در حیوان آزمایشگاهی اولین قدم است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی سه رقت آنتی‌ژن ای-کولی K۹۹ در ایمنی‌زایی موش با روش الایزا انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری

باکتری *E. coli* K۹۹ از بخش میکروبیولوژی موسسه رازی تهیه گردید. پس از کشت باکتری در محیط مک کانکی و بلاد آگار، باکتری ای-کولی K۹۹ در محیط اختصاصی مینکای جامد تحت شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت اینکوبه گردید. برای بررسی وجود آنتی ژن K۹۹، با روش آگلوتیناسیون اسلایدی با آنتی‌بادی اختصاصی K۹۹ (ساخت شرکت Must Group انگلستان) تست شد. در مرحله بعد استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سینا ژن (Cina-Gene, Iran) انجام گرفت. به دنبال آن تست PCR با استفاده از پرایمرهای F۴۱، ST و K۹۹ (جدول۱) (۲۳) انجام، سپس به منظور بررسی محصولات PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد به همراه بافر TBE انجام شد. در نهایت با رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده‌ی باندهای تشکیل شده تحت تاثیر نور UV، حضور ژن های مورد نظر تأیید و تشخیص داده شد. پس از تأیید نهایی با تست‌های آنتی سرمی و PCR، باکتری طبق مراحل زیر غیرفعال و جهت تزریق به موش آماده گردید.

کشت باکتری در محیط مینکا

یک میلی‌لیتر از کشت پنج ساعته باکتری در پپتون واتر درون ارلن حاوی یک لیتر مینکا تلقیح و در شیکر انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ساعت نگهداری گردید.

غیرفعال کردن باکتری

پس از انجام تست‌های آگلوتیناسیون و اطمینان از بیان فیمبریه K۹۹، با اضافه کردن فرمالین ۰/۴ درصد و نگهداری یک شب در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه، باکتری غیرفعال شد. سپس به منظور تایید مرگ باکتری‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه غیرفعال شده بر روی محیط آگار خون‌دار کشت داده تا با عدم رشد، از مرگ باکتری‌ها اطمینان حاصل گردد.

شستشو و تهیه آنتی‌ژن خالص

باکتری غیرفعال شده دو بار با PBS استریل شسته و به مدت ۲۰

شکل ۱- نحوه هموژنیزه کردن آنتی ژن K۹۹ ای-کولای غیر فعال شده با ژل آلوم به وسیله پل ارتباطی.

عامل بیماریزا	توالی پرایمر	اندازه پرایمر(bp)
K۹۹	TATTATCTTAGGTGGTATGG GGTATCCTTTAGCAGCAGTATTTC	۳۱۴
F۴۱	GCATCAGCGGCAGTATCT GTCCCTAGCTCAGTATTATCACCT	۳۸۰
STa	GCTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	۱۹۰

جدول ۱. پرایمرهای اختصاصی ای-کولی K۹۹

دقیقه در دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی که حاوی زواید سطحی باکتری و فرمالین است دور ریخته شد و رسوب حاصل طبق استاندارد مک فارلند، در سه غلظت ۳×۱۰^{۷}، ۳×۱۰^{۱۱} و ۳×۱۰^{۱۳} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر تنظیم شد.

استفاده از ادجوانت و تعدیل‌کننده‌های ایمنی

ابتدا پودر هیدروکسید آلومینیم با غلظت نهائی چهار درصد در آب مقطر حل شد. سپس به صورت حجم به حجم به نمونه آنتی‌ژن با غلظت‌های مذکور اضافه گردید. در نهایت غلظت ژل در محلول دو درصد بدست آمد.

طریقه مخلوط‌کردن آنتی‌ژن با ادجوانت

ادجوانت و باکتری هر کدام به یک میزان در دو سرنگ استریل جداگانه کشیده شد، پس از جدا کردن سوزن از سرنگ‌ها دو سر سرنگ‌ها به دو انتهای پل (پل قبل از استفاده در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون استریل گردید)، به طور محکم وصل شد و محتویات بخوبی با هم مخلوط گردید (شکل ۱). محلول یکنواخت شده آماده تزریق به حیوان بود.

انتخاب حیوان آزمایشگاهی

تعداد ۴۰ سر موش (نژاد Balb/C از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) با وزن تقریبی ۳۰ گرم و سن چهار هفته به منظور ایمن‌سازی انتخاب شد(چهار گروه ۱۰ تایی). سه گروه به عنوان گروه مورد آزمایش و یک گروه ۱۰ تایی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. گروه‌های مورد آزمایش دو دز تزریق را به فاصله دو هفته و به صورت زیر پوستی با غلظت‌های ۳×۱۰^{۷}، ۳×۱۰^{۱۱} و ۳×۱۰^{۱۳} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر و همچنین گروه کنترل فقط نرمال سالین استریل بدون جرم باکتری به همین صورت دریافت نمود.

ایمن‌سازی موش

برای تزریق، موش‌ها به پشت خوابانده شدند و ابتدا کشاله ران با پنبه آغشته به الکل ضدعفونی شد و محلول به صورت زیرجلدی به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر تزریق شد.

کنترل حیوان آزمایشگاهی (Safety)

به مدت ۱۰ هفته طی خون‌گیری، بازدیدهای روزانه از قفس‌ها جهت سلامت موش‌ها انجام شد.

خون‌گیری

خون‌گیری از موش‌ها به مدت ۱۰ هفته پس از اولین تزریق انجام شد. برای این کار موش‌ها به پشت خوابانده و دست و پای آن‌ها را گرفته شد و خون‌گیری انجام شد.

استانداردکردن الایزا

نظر به اینکه کیت تجاری الایزا موجود نیست لذا ابتدا این تست استاندارد شد. برای این منظور نیاز به اندازه‌گیری و مشخص کردن مقدار آنتی‌ژن برای پوشاندن در کف پلیت ۹۶ خانه‌ی مخصوص الایزا بود. دو رقت ۵×۱۰^{۶} و ۱۰×۱۰^{۶} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر از آنتی‌ژن خالص غیرفعال شده باکتری در کف پلیت الیزا پوشش داده شد. پس از ۲۴ ساعت با توئین ۲۰ شستشو داده شد و سپس آلبومین سرم گاوی یک درصد (بلاکر) اضافه گردید. پس از آن رقت‌های مختلف سرم کنترل مثبت و کنترل منفی اضافه شد. سپس رقت‌های مختلف آنتی‌بادی ضد موشی کونژوگه با آنزیم پراکسیداز اضافه و در انتها سوبسترا و بعد از آن برای توقف آزمایش از اسید سولفوریک استفاده شد. در انتها با دستگاه الایزا ریدر نتایج قرائت و ثبت شد (سرم کنترل مثبت با تزریق متوالی باکتری غیر فعال شده به همراه ادجوانت فروند کامل و سپس ناقص بدست آمد).

الایزا

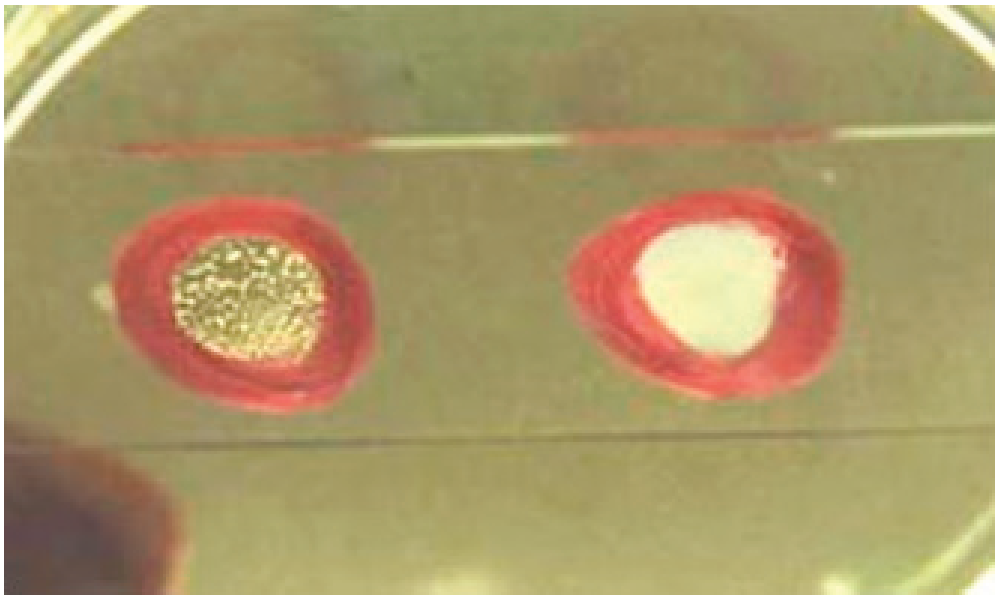
تیتر آنتی‌بادی نمونه‌های سرم بدست آمده از موش در زمان‌های مختلف با استفاده از الایزا محاسبه گردید. در نهایت نتایج با روش ANOVA در نرم افزار SPSS ۱۶ با میزان خطای کمتر از ۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. به جهت اعتبار، آزمایش دوبار تکرار گردید.

نتایج

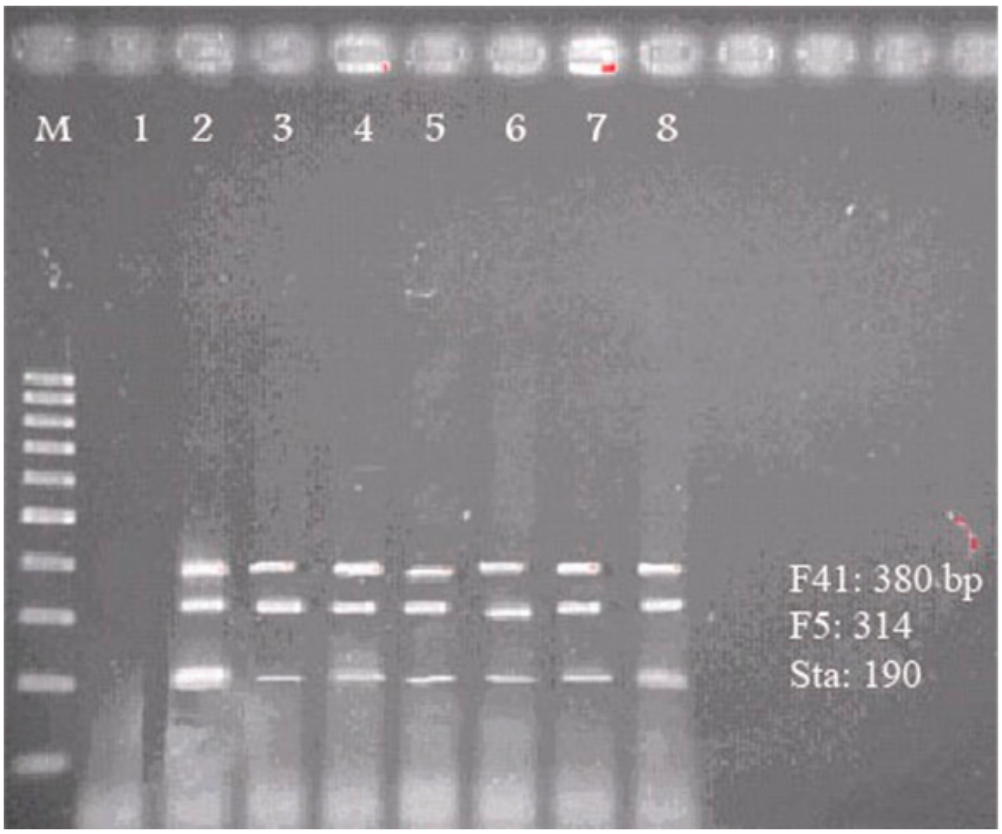
پژوهش حاضر به منظور تعیین و آشکار شدن میزان آنتی‌بادی بر علیه باکتری K۹۹ ای-کلی در حیوانات آزمایشگاهی (موش) با سه رقت مختلف آنتی‌ژن انجام شد.

کشت و جداسازی

نمونه کشت داده شده بر روی محیط‌های مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو (EMB) به‌ترتیب کلنی‌های صورتی و جلای سبز فلزی ایجاد کرد.



شکل ۲- واکنش مثبت ای-کولی به تست اسلاید آگلوتاسیون توسط آنتی‌سرم تجاری K۹۹. چپ: واکنش مثبت، راست: واکنش منفی.



شکل ۳-نتایج PCR و تشکیل باندهای K۹۹: ۳۱۴، STa: ۱۹۰ و F41: ۳۸۰. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱: نمونه کنترل منفی، ۸-۲: نمونه‌های مثبت.

نتایج رنگ‌آمیزی

بررسی کلنی‌ها با میکروسکوپ در رنگ‌آمیزی، باکتری گرم منفی را نشان داد.

نتایج تست‌های بیوشیمیایی

نمونه‌ها بر روی محیط‌های ایندول، MR و SIM مثبت و اوره، VP و سیترات منفی و در TSI به صورت اسید/اسید همراه با تولید گاز بود.

شناسایی ای-کولی K۹۹ توسط آگلوتاسیون اسلایدی

نتایج آزمایش آگلوتاسیون با آنتی‌سرم تجاری K۹۹ نیز مثبت گردد (شکل ۲).

شناسایی ژن‌های عوامل بیماری‌زایی توسط Multiplex PRC

نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی فیمبریه K۹۹، F۴۱ و انتروتوکسین STa مورد بررسی قرار گرفت و نتایج PCR در (شکل ۳) نشان داده شده است.

تست استریلیتی

کشت باکتری برروی محیط آگارخون‌دار، جهت تایید غیرفعال شدن باکتری در اثر فرمالین نشان داد که باکتری کاملا غیرفعال شده و هیچ کلنی در سطح پلیت رشد نکرد.

تست سلامتی

پس از تزریق زیرجلدی سوسپانسیون باکتری اشریشیا کلی K۹۹ غیرفعال شده در غلظت‌های دو برابر معمول، هیچ‌گونه مرگ و میری در موش‌ها مشاهده نشد.

الایزا

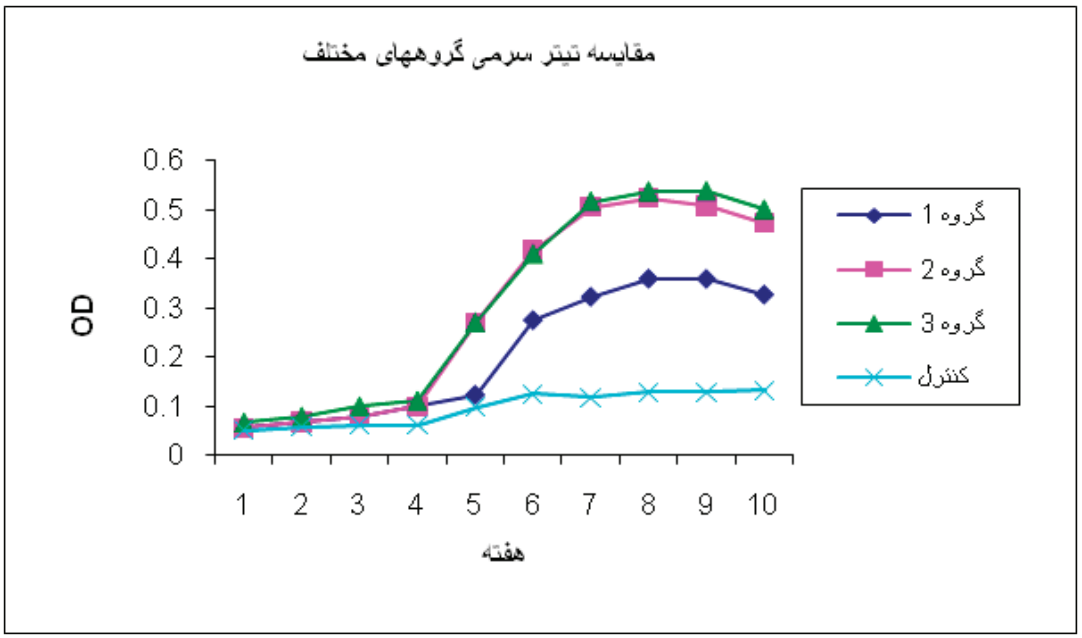
در استانداردسازی آزمایش الایزا با تعداد ۵×۱۰^{۶} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر باکتری درکف هر چاهک و سرم رقیق شده به میزان ۱:۲۵ و همچنین رقت آنتی‌بادی کونژوگه با آنزیم پروکسیداز به نسبت ۱:۳۰۰۰ بازمان ایجاد رنگ به مدت ۱۵ دقیقه و در طول موج ۴۵۰ نانومتر بهترین نتیجه را ایجاد کرد.

نتایج حاصل از بررسی آزمایش الایزا در گروه‌های مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این گروه‌ها بترتیب شامل گروه اول $۱۰^{۷}$، دوم $۱۰^{۱۱}$ و سوم $۱۰^{۱۳}$ واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر با مضرب سه، آنتی‌ژن دریافت کرده بودند.

تیترسرمی درگروه کنترل درطول ۱۰ هفته افزایش نشان نداد، اما در گروه‌های آزمایش ازهفته چهام تا هشتم، افزایش و پس از آن بتدریج کاهش تیتر مشاهده شد (شکل ۴).

مقایسه تیتر سرمی هفتگی در هر کدام از گروه‌های کنترل و آزمایش انجام گرفت. تیتر سرمی هفتگی در همه گروه‌ها تا هفته چهارم تقریبا بدون تغییر بود ($p > ۰/۰۵$). اما بعد از آن در هر سه گروه آزمایش افزایش هفتگی تیتر تا هفته هشتم با اختلاف آماری معنی دار مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$). در حالیکه گروه کنترل کماکان تیتر پایینی داشت.

مقایسه تیتر سرمی هر سه گروه آزمایش با کنترل از هفته اول تا چهارم تفاوت آماری معنی‌دار نشان نداد ($p > ۰/۰۵$)، در حالی‌که از انتهای هفته چهارم تا دهم این تفاوت به طور قطع معنی‌دار مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$) (شکل ۵). از مقایسه درون گروهی بین گروه اول و دوم، اول و سوم و همچنین دوم و سوم نیز نتایج جالبی بدست آمد، به



شکل ٤- نتایج تیتر سرمی در گروه‌های مختلف. گروه های اول، دوم و سوم به ترتیب ۳×۱۰^{۷}، ۳×۱۰^{۱۱} و ۳×۱۰^{۱۳} آنتی ژن دریافت کردند. گروه کنترل افزایش تیتر نشان نداد.

جذب نوری گروه‌های مختلف		
کنترل	اول	دوم
۰,۰۵۰۰	۰,۰۵۵۰	۰,۰۵۶۰
۰,۰۵۸۰	۰,۰۶۶۰	۰,۰۶۸۰
۰,۰۶۰۰	۰,۰۷۷۰	۰,۰۷۸۰
۰,۰۶۰۰	۰,۰۹۸۰	۰,۰۹۹۰
۰,۰۹۷۵	۰,۱۲۲۵	۰,۲۷۰۰
۰,۱۲۶۰	۰,۲۷۴۵	۰,۴۱۸۵
۰,۱۱۶۵	۰,۳۲۲۰	۰,۵۰۵۵
۰,۱۲۷۵	۰,۳۵۹۰	۰,۵۲۲۵
۰,۱۲۸۵	۰,۳۵۸۵	۰,۵۰۷۵
۰,۱۳۲۰	۰,۳۲۶۵	۰,۴۷۱۵

جدول ۲. مقایسه میزان تیتر آنتی بادی درون گروهی در گروه اول و دوم (P<0.05).

جذب نوری گروه‌های مختلف		
کنترل	اول	دوم
۰,۰۵۰۰	۰,۰۵۵۰	۰,۰۶۶
۰,۰۵۸۰	۰,۰۶۶۰	۰,۰۷۸
۰,۰۶۰۰	۰,۰۷۷۰	۰,۰۹۹
۰,۰۶۰۰	۰,۰۹۸۰	۰,۱۱
۰,۰۹۷۵	۰,۱۲۲۵	۰,۲۷۰۵
۰,۱۲۶۰	۰,۲۷۴۵	۰,۴۱
۰,۱۱۶۵	۰,۳۲۲۰	۰,۵۱۶۵
۰,۱۲۷۵	۰,۳۵۹۰	۰,۵۳۷
۰,۱۲۸۵	۰,۳۵۸۵	۰,۵۳۷۵
۰,۱۳۲۰	۰,۳۲۶۵	۰,۵

جدول ۳. مقایسه میزان تیتر آنتی بادی درون گروهی در گروه اول و سوم (P<0.05).

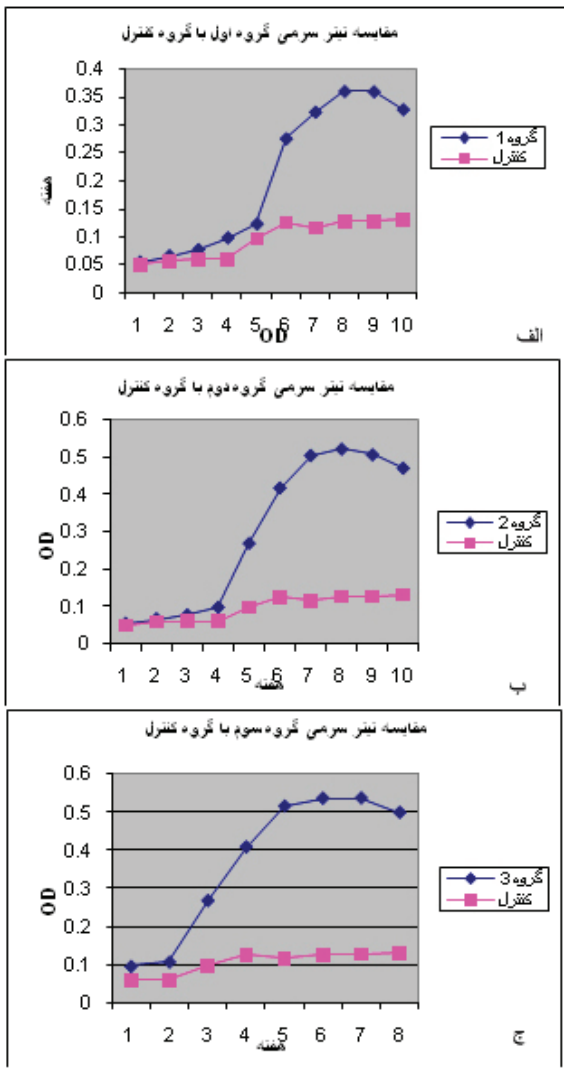
جذب نوری گروه های مختلف		
کنترل	اول	دوم
۰,۰۵۰۰	۰,۰۵۶۰	۰,۰۶۶۰
۰,۰۵۸۰	۰,۰۶۸۰	۰,۰۷۸۰
۰,۰۶۰۰	۰,۰۷۸۰	۰,۰۹۹۰
۰,۰۶۰۰	۰,۰۹۹۰	۰,۱۱۰۰
۰,۰۹۷۵	۰,۲۷۰۰	۰,۲۷۰۵
۰,۱۲۶۰	۰,۴۱۸۵	۰,۴۱۰۰
۰,۱۱۶۵	۰,۵۰۵۵	۰,۵۱۶۵
۰,۱۲۷۵	۰,۵۲۲۵	۰,۵۳۷۰
۰,۱۲۸۵	۰,۵۰۷۵	۰,۵۳۷۵
۰,۱۳۲۰	۰,۴۷۱۵	۰,۵۰۰۰

جدول ۴. مقایسه میزان تیتر آنتی بادی درون گروهی در گروه اول و سوم (P>0.05).

طوری‌که بین گروه اول و دوم، و اول و سوم افزایش تیتر دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود (p < ۰/۰۵)، در حالی‌که این تفاوت در مقایسه گروه دوم و سوم مشاهده نگردید (p > ۰/۰۵) (جداول ۲ الی ۴).

بحث

با توجه به گسترش سریع و شیوع بالاي بیماری‌های ناشی از ETEC در جهان و همچنین اهمیت آن به عنوان یکی از پاتوژن‌های مهم انساني، امروزه تحقیقات قابل توجهی در این زمینه انجام گرفته است (۲۲). اما تاکنون در زمینه ارزیابی تیتر سرمی باکتری ای-کولی K۹۹ در



شکل ۵- نتایج تیتر سرمی گروه های مختلف به طور جداگانه با کنترل: الف) مقایسه گروه اول با گروه کنترل، ب)مقایسه گروه دوم باگروه کنترل و ج)مقایسه گروه سوم با گروه کنترل. گروه های اول، دوم و سوم بترتیب ۳×۱۰^۷، ۳×۱۰^۱۱ و ۳×۱۰^۱۳ آنتی ژن دریافت کردند.

حیوان آزمایشگاهی موش، در ایران مطالعه ای صورت نگرفته است لذا دراین مطالعه، از روش الایزا به منظور بررسی ایمنی‌زایی در حیوان آزمایشگاهی و بدست آوردن حد اکثر تیتر آنتی‌بادی، استفاده گردید.

در تحقیق حاضر جهت بیان فیمبریه K۹۹ از محیط مینکا استفاده شد. استفاده از این محیط و شرایط مختلف رشد از لحاظ pH و درجه حرارت انکوباسیون و همچنین مدت زمان انکوباسیون توسط ناگی و همکاران درسال ۲۰۰۵ مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که محیط مینکا شرایط مناسب برای بیان رشد آنتی‌ژن K۹۹ را دارد (۱۷). بدیعی و همکاران نیز که تولید آنتی‌ژن K۹۹ را در دو محیط کشت سنتزی و کامل مقایسه کردند به این نتیجه دست یافتند که محیط‌های کشت سنتزی مینکا، در مقایسه با محیط آگار خون‌دار ارجح است که با نتایج تحقیق جاری مطابقت دارد (۳). در مطالعه حاضر از تکنیک Multiplex PCR برای تفکیک و تشخیص ژن‌های مورد نظر استفاده شد. السویک در سال ۱۹۹۳ برای نخستین بار از PCR جهت تشخیص ای-کولی انتروتوکسیژنیک استفاده کرد (۱۹). فرانک و همکاران در سال ۱۹۹۸ نیز نشان دادند که PCR ابزار تشخیصی حساس، سریع و نسبتا ارزان جهت تشخیص ژن‌های عوامل بیماری‌زایی در ای-کولی‌های انتروتوکسیژنیک در گوساله‌های مبتلا به اسهال می‌باشد (۱۰).

در این مطالعه، پس از جداسازی و شناسایی باکتری ای-کولی K۹۹، به منظور ایجاد ایمنی و بررسی آنتی‌بادی‌های ایجادشده علیه باکتری در حیوان آزمایشگاهی موش، باکتری با فرمالین ۰/۴ درصد غیرفعال شد و از آلومینیوم هیدروکسید به عنوان ادجوانت استفاده گردید. ادجوانت‌ها با افزایش پایداری آنتی‌ژن و رهاسازی تدریجی آن در موش به نحوی که به تماس طولانی مدت آن‌ها با سیستم دفاعی منجر شود، باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی می‌گردد (۱). واژه ادجوانت از کلمه لاتین Adjuvare به معنی کمک یا افزایش، مشتق شده است. ادجوانت‌ها، ترکیبات شیمیایی یا بیولوژیک هستند که باعث تحریک غیراختصاصی سیستم ایمنی، علیه آنتی‌ژن‌هایی می‌شوند که به همراه آن تزریق شده است (۸). از جمله شناخته شده‌ترین ادجوانت‌ها، فروند و آلوم می‌باشد. نمک‌های آلوم، بیشتر به شکل فسفات آلومینیوم یا هیدروکسید آلومینیوم به شکل گستردهای به عنوان ادجوانت‌های انسانی استفاده شده‌اند (۱). استفاده از ادجوانت جهت افزایش تیترآنتی‌بادی توسط محققان دیگر نیز انجام شده است. فیگوریدو و همکاران در سال ۲۰۰۴ به منظور بررسی و یافتن آنتی‌بادی علیه فیمبریه K۹۹ و F۴۱ از سویه‌ی ای-کولی در گاوهای باردار، آنتی‌ژن را با آلومینیوم و پتاسیم سولفیت به عنوان ادجوانت به حیوان تزریق نمودند (۸).

در مطالعه حاضر از موش استفاده شد زیرا پستاندار ارزان‌تر و قابل دسترسی در آزمایشگاه می‌باشد و همچنین دارای اندازه کوچک و باروری بیشتر است. در بررسی انجام شده توسط مریون در سال ۱۹۸۸، از نوزاد موش به عنوان مدلی برای ایمن‌سازی در برابر آنتی‌ژن‌های K۹۹ و F۴۱ باکتری اشریشیاکلی استفاده شد و واکسن ترکیبی شامل K۹۹ و F۴۱ بیشترین حفاظت و کمترین میزان مرگ و میر را در موش‌های نوزاد به دنبال داشت (۱۵). همچنین ژوفه و همکاران در سال ۱۹۹۱، برای بررسی بیماری اسهال در دام‌های تازه متولد شده که توسط عوامل فیمبریایی P۹۸۷.K۸۸ و K۹۹ باکتری ای-کولی و روتا ویروس ایجاد شده بود، از واکسن ترکیبی بر روی حیوانات آزمایشگاهی خرگوش و موش استفاده کردند. نتایج به دست آمده، افزایش پادتن را در سرم نشان داد (۲۵).

در مطالعه حاضر، ایمن‌سازی موش بر علیه باکتری ای-کولی سویه K۹۹ با تزریق زیر جلدی سوسپانسیون باکتری ای-کولی K۹۹ غیر فعال شده در غلظت‌های ۳×۱۰^{۷}، ۳×۱۰^{۱۱} و ۳×۱۰^{۱۳} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر بهمراه ادجوانت صورت گرفت. برای ارزیابی پاسخ ایمنی، با استفاده از آزمایش الایزای غیرمستقیم که در آزمایشگاه استاندارد شد، آنتی‌بادی تولید شده مورد سنجش قرار گرفت. محققان زیادی جهت بررسی ایمونولوژیکی تیتراسیون سرمی پادتن‌های ضد K۹۹ ای-کولی از تست الایزا استفاده کردند از جمله: اکی و همکاران در سال ۲۰۰۷ طی مطالعه‌ای بر روی اتیولوژی اسهال در گوساله‌های تازه متولد شده با استفاده از تکنیک الایزا روتاویروس، کوروناویروس و ای-کولی K۹۹ را تشخیص دادند (۱۸). بدیعی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای تحت عنوان تشخیص آنتی‌ژن در اسهال گاوهای شیری هلشتاین که مبتلا به K۹۹ ای-کولی بودند از تست الایزا جهت بررسی پادتن علیه آنتی‌ژن K۹۹ استفاده کردند. نتایج تیتر سرمی نشان داد در گاوهای با تولید محصول کمتر و سن کمتر بین دو تا سه سال تولید ایمونوگلوبولین کمتر از گاوهای با تولید محصول لبنی بالا و مسن‌تر بوده است (۳).

در تحقیق حاضر روند افزایش آنتی‌بادی بعد از تزریق آنتی ژن در سرم موش‌های مورد آزمایش از هفته چهارم به بعد ادامه یافت و به حداکثر خود رسید، زیرا معمولا از دو هفته بعد از تزریق دوم در اثر وجود آنتی‌ژن در بدن، تیتر آنتی‌بادی بالا می‌رود که با آزمایش الیزا قابل ردیابی است (۹). نتایج فیگوریدو و همکاران درسال۲۰۰۴، در بررسی آنتی‌بادی سرم گوساله‌ها و گاوهای ایمن، افزایش تیتر پادتن از هفته چهار تا هفت، بیانگر این مطلب بود که واکسن توسعه یافته علیه باکتری ای-کولی بیشترین حفاظت را در برابر بیماری اسهال داشت (۸). داچت ساچاکس در سال۲۰۰۴، با ایمن‌سازی نوزاد موش در ارزیابی آنتی‌ژن‌های K۹۹ و F۴۱ بیشترین حفاظت و افزایش تیتر از هفته سوم تا نهم به بعد و بدنبال آن کاهش تیتر را گزارش کردند (۶). کروش و همکاران در ۲۰۰۱ برای بررسی اثر فیمبریه K۹۹ ای-کولی، روتا و کورونا ویروس، گوساله‌های تازه متولد شده را به چالش کشیدند. بررسی سطح بالای پادتن از هفته چهارم علیه عوامل یاد شده بیانگر حفاظت گوساله‌ها در برابر اسهال بود (۵). جرمین و همکاران در سال ۲۰۱۱ به منظور بررسی اثر فیمبریه K۹۹ سویه ای-کولی، سرم گاوهای باردار ایمن‌سازی شده را مورد بررسی قرار دادند. تیتر ایمنی از هفته ششم حالت صعودی داشت و با رسیدن به قله سیر نزولی پیدا کرد (۱۱). در سال ۱۳۸۶ نتایج بررسی انجام شده توسط ربانی و همکاران، حضور قابل توجه آنتی‌بادی‌های ضد ای-کولی K۹۹ را در هر دو جمعیت گوساله‌های سالم و مبتلا به اسهال، عدم ارتباط بین سطح سرمی این آنتی‌بادی و حفاظت گوساله‌ها را در برابر اسهال نشان داد (۲۱)، این مطالعه در نوع خود با تحقیقات سایر محققان مغایرت داشت. اگرچه ایمنی‌زایی بوسیله آنتی‌ژن کامل باکتری K۹۹ ای-کولی اختصاصی نیست، یعنی ایمن‌زایی به طور خاص بر علیه یک آنتی‌ژن خاص مثل F۴۱ یا K۹۹ نیست، اما ایمن‌زایی کامل است. به عبارت دیگر برعلیه هر کدام از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن باکتری،

ایمنی‌زایی صورت گرفته است (۷). حاد بودن سویه مورد استفاده در تهیه آنتی‌ژن از دلایل دیگر افزایش تیتر ایمنی در مدت زمان کوتاه‌تر است، هرچه باکتری حادتر باشد باعث تحریک بیشترسلول‌های ایمنی می‌شود و همین امر افزایش تیتر ایمنی را به دنبال دارد (۱۶).

تیتر آنتی‌بادی گروه‌های دوم و سوم در مقایسه با گروه اول نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد. این اختلاف دلالت بر تحریک بیشتر سیستم ایمنی در غلظت‌های بالای آنتی‌ژن دارد.اما عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه دوم و سوم نشان‌دهنده این است که افزایش غلظت آنتی‌ژن تا حد معینی باعث افزایش میزان آنتی‌بادی می‌شود و افزایش بیش از حد غلظت آنتی‌ژن تاثیر چندانی بر میزان ایمنی ندارد. این امر به اشباع شدن سلول‌های ایمنی توسط آنتی‌ژن‌های مورد نظر بر می‌گردد. به عبارت دیگر، زمانی‌که جایگاه‌های سلول‌های ایمنی توسط اپی توپ‌های آنتی‌ژن تزریق شده پر و سپس اشباع می‌شود، پس از آن افزایش بیش از حد آنتی‌ژن تاثیر چندانی بر میزان ایمنی ندارد (۴).

نتایج بررسی حاضر و مطالعات انجام شده توسط دیگر محققان حاکی از آن است که ارائه‌ی یک مدل حیوانی برای بررسی ایمنی و بیماری‌زایی ای-کولی انتروتوکسیژنیک و دیگر عوامل بیماری‌زای ایجادکننده اسهال ضروری است. بهره‌گیری از یک مدل حیوانی می‌تواند در ارائه معیاری برای انتخاب کاندیدای واکسن در پیشگیری از بیماری اسهال و مقابله با آن مفید باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی مشاهدات نشان داد آنتی‌ژن غیرفعال باکتری ای-کولی K۹۹ باعث تحریک سیستم ایمنی در موش‌ها می‌شود. چنین ایمنی حفاظتی در اثر مواجه شدن با آنتی‌ژن سبب افزایش عیار پادتن علیه K۹۹ ای-کولی و ایجاد ایمنی می‌گردد. همچنین نتایج نشان داد افزایش غلظت آنتی‌ژن تا حد معینی باعث افزایش میزان آنتی‌بادی می‌شود و افزایش بیش از حد غلظت آنتی‌ژن تاثیر چندانی بر افزایش تیتر ایمنی ندارد. در نهایت این نوع ایمنی‌زایی در صورتی‌که به موقع صورت گیرد می‌تواند به عنوان روش جایگزین درمان آنتی‌بیوتیکی برای عفونت‌های باکتریایی از جمله ای-کولی K۹۹ مورد استفاده قرار گیرد. انجام تحقیق در حیوان هدف مثل گاو و گوساله نیز پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از جناب آقای دکتر سید محمدحسین حسینی بخاطر زحمات در انجام و استاندارد کردن الایزا و همچنین کارکنان بخش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی شیراز کمال تشکر و امتنان را دارند. این مقاله با حمایت موسسه رازی با پروژه شماره مصوب ۹۱۱۱۳-۱۸-۸۴-۲ انجام شده است.

منابع مورد استفاده

1. Aguilar, J.C., Rodriguez, E,G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 25 (19): 3752- 3762.

2. Andrews, A. H., Blowey, R. W., Boyd, H. Eddy, R. G. (2004). Bovine medicine disease and husbandry of cattle. 2nd edition. Blackwell Publishing. *AAAP*.Pp: 186-230.

3. Badiei, K.h., Pourjafar, M., Ghane, M. (2011). Fecal *E. coli* F5 (k99) Antigen in Diarrheric calves of high and Average producing Holstein dairy cows. *Global Vet.* 5 (3): 175-1179.

4. Bertin, A. (2000). F41 antigen as a virulence factor in the infant mouse model of *Escherichia coli* diarrhoea. J. Gen. *Microbiol*. 131 (2): 3037-3045.

5. Crouch, F., Oliver., S., Francis, M.J. (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, corono virus and *Escherichia coli* K99.Vet. Rec.149 (4): 105-108.

6. Duchet-Suchaux, M. (2002). Protective antigens against enterotoxigenic *Escherichia coli* 0101:K99, F41 in the infant mouse diarrhea model. *Infect. Immun.* 56 (6):1364-1370.

7. Duchet-Suchaux, M., Bertin, A., Dubray, G. (2006). Morphological description of surface structures on strain B41 of bovine enterotoxigenic *Escherichia coli* bearing both K99 and F41antigens. *J. Gen. Microbiol.* 134(1): 983-995.

8. Figueiredo, H.C.P., Large, A.P., Pereiaj Unior, F.N., Leite, R.C. (2004). Passive immunity in cattle againts ETEC. Serologic evaluation of a bacterin containing k99 and F41 Fimbria in colostrum of vaccinated Females and calf serum. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56 (12): 425-432.

9. Forman, A.J., Acres, S.d., Kapitany, R.A., Buckley, M.L., Stainer, D.W., Maxwell, M.A.B. (1981). The Immunogenicity of K99 Antigen in Whole cell Bacterins of *Escherichia coli*. *Can. J. Comp. Med.* 46 (4): 426-429.

10. Franck, S. M., Bosworth, B. T., Moon, H. W. (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin. Microbiol.* 36 (2): 1795-1797.

11. Germine , S.S., Ebied, M.H., Ibrahim, F.K., Mettias, K.N., Daoud, A.M. (2011). Field evalution of egg yolk antibodies in prevention and treatment of enteric coli bacilosis in calves. *Benha Vet. Med. J.*, Special Issue 1: 108-114.

12. George, M., Garrity, E.D. (2005). The Gammaproteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2B (2nd ed.). New York: Springer. British Library no. GBA561951.Pp: 1108-2.

13. Gorbach, S.L., Banwell, J.G., Chatterjee, B.D., Jacobs, B., Sack R.B. (1971). Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. I. Alterations in intestinal micrflora. *J Clin Investig*. 50 (3):881-9.

14. Johnson, A.M., Kaushik, R.S., Francis, D.H., Fleckenstein, J.M., Hardwidge, P.R. (2009). Heat-labile enterotoxin promotes *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacte-*

riol. 191(1):178-186.

15. Marion, D. (1988). Prodective against Enterotoxigenic *Escherichia coli* O101;k99,f41 in the infant mouse diarrhea model. Infect. *Immun*. 5(3): 1364-1370.

16. Morris, J. A., Thorns, C., Scott, A. C., Sojka, W. J., Wells, G. A. (2003). Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen (F41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infect. Immun.* 36(1):1146-1153.

17. Nagy, B., Fekete, P.Z. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol.* 295 (6): 443-454.

18. Ok, M., Guler, L., Turgut, K., Ok, U., Sen, I., Gunduz, K., Birdane, M.F.,Guzelbektes, H. (2008). The studies on the Aetiology of Diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* Strains by multiplex PCR. *Zoonoses Public Health.* 56 (2): 94-101.

19. Olsvik, O., Strockbine, N. A. (1993). PCR detection of heat-stable, heat-labile, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In Diagnostic Molecular Microbiology. *Principles and Appl.* 233(3): 445-451.

20. Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S.G., Bradley, S. R. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(5):465-83.

21. Rabbani, M., Khabardezfooli, M., Zahraee Salehi, T., Yoosefiramandi, A., Baahonar, A., Rezazadeh, F. (2007). Evaluation of antibodies against *E. coli*, rotavirus and coronavirus in serum of calves under one month of age with diarrhea and healthy calves. *Vet Res J.* 3 (2): 145-149.

22. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. (2000). Veterinary Medicine, 9th Ed. W.B. Saunders; London. Pp: 734-738.

23. Shams, Z., Tahamtan, Y. , Pourbakhsh, A. , Hosseiny, M. H. , Kargar, M. Hayati, M. (2012) Detection of enterotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal sample of calves by molecular and serological methods. Comp. *Clin. Pathol.* 21(4): 475–478.

24. Walker, R.I., Steele, D., Aguado, T. (2007). Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine*. 25 (3): 2545-2566.

25. Zhffa, A., Sslajka, E., Zajak, j. (1991). Antibody response in mice,rabbits and piges in response to vaccination with an inactivated oil vaccine coataining rotavirus and *Escherichia coli* strains with k88, k99 and 987p fimberial antigens. *Vet. Med.* 36(1): 423-431.