مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره شانزدهم/ پائیز ۱۳۹۰/ ۳۰-۲۰

بررسی ایمنی حفاظتی لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا در مواجهه با دوز کشندهٔ این باکتری در موش

یوسف مطهری نیا[۱]، رضا شاپوری[۲]، مهدی رهنما[۳]، محمد رضا علی رمائی[۱]، محمدرضا رحمانی[۴]، محمد علی رضایی[۵]

۱- کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن :۴۲۲۱۰۳۰-۰۲۴۱

rezashapoury@yahoo.com

۳ -استادیار گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم پایه و پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

۴ -استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵-مربی گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: لژیونلا پنوموفیلا عامل بیماری لژیونر بوده که می‌تواند کشنده باشد و تا به حال واکسنی برای آن تهیه نشده است. همچنین آنتی ژنهای این باکتری محرک سیستم ایمنی هستند. هدف از این مطالعه مقایسهٔ ایمنی‌زایی لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا در مواجهه با دوز کشندهٔ این باکتری در مدل موشی است.

روش بررسی: پس از کشت انبوه باکتری، لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی این باکتری با روش فنل داغ و تیمار آنزیمی به دست آمد. الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید برای لیپو پلی ساکارید و فرکشن پروتئینی انجام شد. برای تهیه واکسن از لیپو پلی ساکارید و فرکشن پروتئینی، ۱۰ میکروگرم از هر آنتی ژن در ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین حل و برای تزریق آماده شد. ۶ گروه موش مادهٔ نوع BALB/c (هر گروه دارای ۱۵ موش) انتخاب شدند. ٤ گروه از موش‌ها به صورت تزریق داخل صفاقی و سه دوز با فواصل دو هفته‌ای مورد واکسیناسیون قرار گرفتند. به دو گروه دیگر به عنوان شاهد فقط نرمال سالین تزریق شد. دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون، به دو گروه از موش‌های واکسینه شده و یک گروه شاهد، دوز کشنده باکتری (LD_{100}) تزریق شد. همچنین شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون، دو گروه دیگر واکسینه شده و گروه شاهد مورد مواجهه قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج مواجهه با دوز کشنده باکتری اول نشان داد که تأثیر ایمنی‌زایی فرکشن پروتئینی و لیپوپلی ساکارید به ترتیب ۸۶/۶۶٪ و ۷۳/۳۳٪ و شش هفته پس از آخرین ایمونیزاسیون ۸۶/۶۶٪ برای فرکشن پروتئینی و ۶۰٪ برای لیپو پلی ساکارید می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که فرکشن پروتئینی و لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا دارای ایمنی حفاظتی مناسبی بوده و گزینه‌هایی برای مطالعات تولید واکسن می‌باشند.

کلید واژه‌ها: لژیونلا پنوموفیلا، ایمنی‌زایی، لیپوپلی ساکارید، فرکشن پروتئینی

وصول مقاله: ۸۹/۱۱/۴ اصلاحیه نهایی: ۹۰/۳/۴ پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۱۷

مقدمه

لژیونلا پنوموفیلا یک باکتری گرم منفی سخت رشد است که مسوول بیماری لژیونر بوده که یک فرم، شدید از پنومونی است و می‌تواند کشنده باشد، همچنین عامل بیماری تب پونتیاک بوده که یک بیماری خود محدود شونده است. این باکتری حضور گسترده‌ای در طبیعت داشته و همچنین می‌توان آن را در سیستم‌های آبی ساخته شده توسط انسان، همچون سیستم‌های تهویه و خنک کنندهٔ هوا، سیستم‌های آب گرم، شیرهای آب، سر دوش‌های حمام و دستگاه‌های تنفس مصنوعی در

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

بیمارستان ها یافت. این سیستم‌ها با تولید قطره‌های ریز آب آلوده به لژیونلا پنوموفیلا عامل عمدهٔ شیوع عفونت به این باکتری بوده‌اند (۲ و۱). مطالعات در طول سه دههٔ گذشته نشان داده است که آنتی ژنهای تخلیص شدهٔ لژیونلا پنوموفیلا تحریک کنندهٔ سلول‌های ایمنی در مدل موشی و شرایط آزمایشگاهی بوده‌اند (۳). این باکتری همچون دیگر باکتری‌های گرم منفی، دارای آنتی ژنهای بسیاری از جمله: لیپوپلی ساکارید، پروتئین شوک گرمایی، پروتئین‌های غشای خارجی، فلاژل و پیلی می‌باشد. لیپو پلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا در مقایسه با لیپوپلی ساکارید باکتری‌های روده‌ای دارای سمیت و تأثیرات تب‌زایی کمتری می‌باشد (٤). در مقایسه با لیپوپلی ساکارید باکتری های گرم منفی دیگر که به طور معمول به گیرندهٔ TLR_4 لکوسیت‌های میزبان متصل می‌شوند، لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا دارای اشکال ساختاری غیر معمول بوده که بیشتر مسئول تحریک گیرنده‌های TLR_2 می‌باشد تا مولکول‌های TLR_4 لکوسیت‌های میزبان، همچنین تمایل آن به اتصال با گیرنده‌های CD_{14} مونوسیت‌های انسانی که عمل شناسایی لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی را انجام می‌دهند کاهش یافته است (۵). در راستای مطالعات گذشته رابطه‌ای بین بیان لیپو پلی ساکارید با مقاومت سرمی، رشد داخل سلولی و بیماری‌زایی این باکتری نشان داده شده است. مطالعات نشان داده است که فقدان ژن *rcp* که ژن اصلاح کنندهٔ لیپید A می‌باشد منجر به کاهش توانایی مقاومت لژیونلا پنوموفیلا و کاهش عفونت سلول‌های میزبان است (۶). سطح ساختاری این باکتری دارای انواع پروتئین‌های مختلف وابسته به پپتیدوگلیکان و منفذهای پورینی می‌باشد. یک پروتئین ۲۸ کیلو دالتونی جزو پروتئین‌های سطحی لژیونلا می‌باشد که به عنوان یک قسمت اتصالی برای چسبیدن پروتئین‌های کمپلمان و در نهایت اپسونو فاگوسیتوز باکتری عمل می‌کند. همچنین یک پروتئین مهم ۲۴ کیلو دالتونی که در سطح این باکتری قرار گرفته است، Mip پروتئین بوده که دارای خاصیت پروپیل-پرولین ایزومرازی می‌باشد (۷). از مهمترین پروتئین‌های دیگر لژیونلا پنوموفیلا، یک لیپوپروتئین غشای خارجی ۱۹ کیلو دالتونی، یک پروتئین ۲۵ کیلو دالتونی و در نهایت پروتئین شوک گرمایی ۶۰ کیلو دالتونی (Hsp60) می‌باشد. گزارش گردیده است که در بیماران لژیونر پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به این باکتری ایجاد می‌شود، همچنین ایمنی به واسطهٔ سلول، نقشی حیاتی در دفاع از میزبان در مقابل عفونت لژیونلا پنوموفیلا دارد (۸و۷). با توجه به حضور گستردهٔ لژیونلا پنوموفیلا در محیط و نبودن یک واکسن مؤثر علیه این باکتری، هدف از این مطالعه مقایسهٔ ایمنی‌زایی لیپو پلی ساکارید و فرکشن پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا در مواجهه با دوز کشندهٔ این باکتری در مدل موشی است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی بوده و در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام شده است. در مطالعه قبلی ما، سوش وحشی لژیونلا پنوموفیلا سروتایپ ۱ از آبهای راکد محیطی در حومهٔ شهر زنجان جداسازی شده و با روشهای بیوشیمیایی و آگلوتیناسیون مورد تأیید قرار گرفت (۹).

کشت انبوه لژیونلا پنوموفیلا:

در این روش، محیط کشت مایع عصارهٔ مخمر (Yeast Extract Broth) برای کشت انبوه استفاده شد که یک لیتر آن شامل: ۱۰ گرم ایسز بافر، ۱۰ گرم

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

عصاره مخمر، ۰/٤ گرم L- سیستئین و ۰/۲۵ گرم فریک پیروفسفات است که pH محیط کشت نیز توسط محلول KOH یک نرمال به میزان ٦/۹ تنظیم شد. ۳۰۰ میلی لیتر از محیط مایع را در ارلن ۱۲۰۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از اتوکلاو، باکتری در آن کشت داده شد و محیط به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباتور دارای همزن انکوبه گردید. برای تأیید عدم آلودگی محیط‌های کشت (YEB) از رنگ‌آمیزی گرم و محیط کشت‌های BCYE-α بدون سیستئین و آگار خون‌دار استفاده شد (۱۰). بیوماس باکتری به دست آمده از کشت انبوه در بافر سالین استریل حل و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و دور g ×۳۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۱). برای پی بردن به استریل بودن بیوماس به دست آمده نیز از آزمون استریلیتی استفاده شد.

تهیه لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی به روش فنل داغ:

۵۰ گرم وزن مرطوب سلولی را در ۱۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و تا دمای ٦٦°C به آن، حرارت غیر مستقیم داده شد، سپس ۱۹۰ میلی‌لیتر محلول فنل۹۰٪ (v/v) را به آن افزوده و در حرارت ٦٦°C درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه همزده شد. سپس محلول بر روی یخ سریعاً سرد و سپس سانتریفیوژ انجام شد (g ٤۰۰۰، ٤۵ دقیقه در ٤°C). لایه فنلی و لایه آبی را جدا کرده و به هر کدام ۱/۲ حجم متانول سرد را برای رسوب دهی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به آن افزوده و بعد سانتریفیوژ (g ٤۰۰۰، ٤۵ دقیقه در ٤ °C) کرده و رسوب به دست آمده که فرکشن پروتئینی همراه اسیدهای نوکلئیک می‌باشد را جدا ساخته و در ٤ درجه سانتی‌گراد برای مرحله تیمار آنزیمی نگهداری شد.

سپس تری کلرواستیک اسید (TCA) به مقدار ۰/۵گرم به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر محلول به آن افزوده شد و برای ۳۰ دقیقه در دمای ٤°C همزده شد. در مرحله بعد محلول سانتریفیوژ شده (در همان دور) و محلول رویی در برابر آب مقطر برای ۲٤ ساعت با ۳ بار تعویض و برای هر بار ٤ لیتر بافر (آب مقطر)، دیالیز شد. سپس LPS با ۳ برابر حجم متانول سرد، رسوب داده شد (۱۳و۱۲).

تیمار آنزیمی لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی:

لیپوپلی ساکارید به دست آمده از روش فنل داغ در بافر تریس ۰/۱ مولار با pH:۷/۵ حاوی ۰/۵٪ SDS و ۱۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم حل گردید و به آن پروتئیناز K (۵۰ میکرو گرم آنزیم به ازای هر ۱۰ میلی‌گرم پروتئین محلول) افزوده شد و برای ۲ ساعت در ٥٦°C و سپس یک شب در٤°C نگهداری گردید. سپس محلول مورد نظر سانتریفیوژ و LPS با متانول سرد رسوب داده شد. رسوب در بافر تریس ۰/۱ مولار با pH:۷/۵ حل گردید و به آن آنزیم‌های DNase و RNase (۵۰ میکروگرم آنزیم به ازای هر ۱ میلی‌گرم اسید نوکلئیک محلول) افزوده شد و برای ۲ ساعت در ۳۷°C انکوبه، سپس سانتریفوژ نموده و در نهایت LPS را با افزودن متانول سرد رسوب داده و فریز درای گردید. میزان آلودگی رسوب لیپو پلی ساکارید با پروتئین به روش براد فورد و میزان آلودگی با اسیدهای نوکلئیک با اندازه‌گیری در A_{260} تعیین گردید. برای فرکشن پروتئینی نیز مشابه با لیپوپلی ساکارید توسط آنزیم‌های DNase و RNase (۵۰ میکروگرم آنزیم به ازای هر ۱ میلی‌گرم اسید نوکلئیک محلول) و ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C تیمار آنزیمی شده و مقدار اسیدهای نوکلئیک با اندازه‌گیری در A_{260} تعیین گردید (۱۳و۱۲).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

آزمون استریلیتی

در این تست از آنتی ژنهای تهیه شده بر روی محیط‌های تایوگلیکولات، نوترینت آگار، بلاد آگار، مکانکی آگار و سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و در شرایط بی‌هوازی و هوازی قرار داده شد تا بعد از مدت زمان مناسب نتایج کشت‌ها مورد بررسی قرار گیرند (۱۳و۱۲).

الکتروفورز لیپو پلی ساکارید و فرکشن پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا:

الکتروفورز LPS در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) با ژل پایین ٪۱۴ حاوی اوره ۴ مولار، ژل بالای ٪۴ حاوی اوره ۴ مولار و بافر نمونه حاوی اوره ۸ مولار انجام شد. در این آزمایش از لیپوپلی ساکارید باکتری سالمونلا تیفی به عنوان نمونهٔ استاندارد استفاده گردید. ژل پس از الکتروفورز با روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد (۱۵و۱۴). همچنین از ژل پلی اکریلامید ۱۵٪ برای الکتروفورز فرکشن پروتئینی استفاده گردید و رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز شده با کوماسی بلو R_{250} انجام گرفت. همچنین از مارکر پروتئینی شرکت فرمنتاس در الکتروفورز فرکشن پروتئینی استفاده گردید (۱۶).

ایمن سازی گروه‌های موشی:

۹۰ عدد موش نژاد BALB/c ماده با سن ۸-۶ هفته از مؤسسه تحقیقاتی رازی کرج خریداری گردید. این موشها بصورت تصادفی انتخاب و به شش گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند، که دو گروه از آنها با لیپو پلی ساکارید، دو گروه با فرکشن پروتئینی به صورت جداگانه (هر کدام با دوزی معادل ۱۰ میکروگرم)، و دو گروه دیگر ۱۵ تایی هم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و به آنها نرمال سالین استریل تزریق گردید. واکسیناسیون به صورت سه دوز (هر بار ۰/۵ میلی‌لیتر) به صورت داخل صفاقی با فواصل دو هفته‌ای انجام گرفت (۱۷و۱۱).

مواجهه با دوز کشنده:

با استفاده از کشت تازه لژیونلا پنوموفیلا و استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر رقت 5×10^{8} CFU که دوز کشنده برای هر موش است، تهیه شد. دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون به یک گروه از موش‌های واکسینه شده و یک گروه شاهد دوز کشندهٔ باکتری به میزان ۰/۵ml برای هر موش به صورت داخل صفاقی تزریق شد و مرگ و میر گروه‌های موشی پس از مواجهه با دوز کشنده (LD_{100}) مورد بررسی قرار گرفت. شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون برای دو گروه واکسینه شده و گروه شاهد مواجهه با دوز کشنده انجام شده و مرگ و میر این گروه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

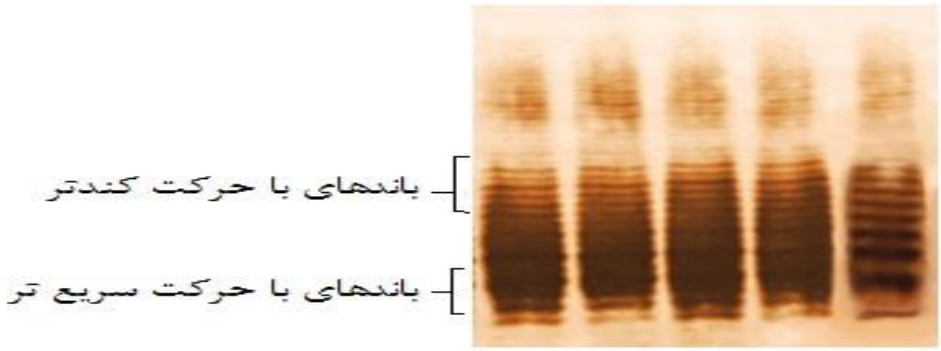
جهت بررسی اختلاف ایمنی‌زایی گروه‌ها از فرمول مقایسهٔ نسبت دو جامعهٔ آماری با استفاده از نرم افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها

طی بررسی با روش براد فورد میزان آلودگی لیپوپلی ساکارید به پروتئین کمتر از دو درصد در هر گرم وزن بدون آب و آلودگی به اسید نوکلئیک کمتر از یک درصد از وزن بدون آب لیپو پلی ساکارید بعد از تیمار آنزیمی بود. بررسی کشت‌های باکتریایی بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت و محیط قارچی بعد از ۷۲ ساعت گرما گذاری حاکی از عدم رشد میکرو ارگانیسم‌ها بر روی محیط‌های نام برده و استریل بودن آنتی ژنهای مورد نظر می‌باشند. نتایج SDS-PAGE برای تأیید LPS لژیونلا پنوموفیلا در شکل ۱ نشان داده شده است. ژل ۱٤٪ و حاوی اوره ٤ مولار می باشد همچنین ژل با روش

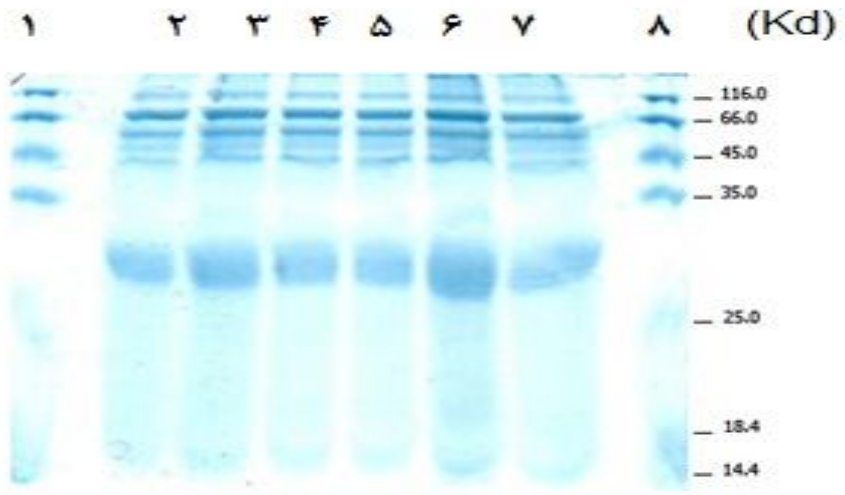
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

حساس نیترات نقره رنگ آمیزی شده است. همانطوری که مشاهده می‌شود دو نوع الگوی حرکتی در الکتروفورز LPS دیده می‌شود. باندهای با حرکت سریع‌تر به علت داشتن اجزای کوچک‌تر LPS که در انتهای ژل قرار گرفته‌اند و شامل لیپید A و ساختارهای OPS (زنجیره جانبی-O) می‌باشند. باندهای با حرکت کندتر که در بالای ژل مشاهده می‌شوند و در حقیقت شامل مولکول سالم و بدون شکستگی LPS می‌باشند که از لحاظ وزنی و حجمی بزرگتر از اجزای آن می‌باشد. با توجه به شکل موجود، فرکشن لیپوپلی ساکارید تخلیص شده با روش فنل داغ و تیمار آنزیمی، هم دارای درصد بالایی از لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا می‌باشد و هم دارای اجزای کوچکتر لیپوپلی ساکارید یعنی لیپید A و پلی ساکاریدها است که این اجزا به نوبهٔ خود از ایمونوژنهای قوی در باکتریهای گرم منفی محسوب می‌شوند. نتایج SDS-PAGE فرکشن پروتئینی نیز ۱۰ باند پروتئینی را نشان می‌دهد که در شکل ۲ قابل مشاهده است. اکثر باندهای پروتئینی در محدودهٔ وزنی ۳۵ تا ۱۱۶ کیلو دالتون قرار گرفته‌اند. نتایج این الکتروفورز نشان می‌دهد که فرکشن پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا دارای پروتئین‌های بسیاری با وزنهای مولکولی مختلف است که هر پروتئین در تولید واکسن می‌تواند نقش یک ایمونوژن را برای تحریک سیستم ایمنی ایفا نماید.



شکل ۱: الکتروفورز لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا روی ژل ۱۴٪ و رنگ‌آمیزی آن با روش نیترات نقره. در باند شماره ۱ لیپو پلی ساکارید باکتری سالمونلا تیفی به عنوان لیپو پلی ساکارید استاندارد با رفت ۳۰ میکرو گرم استفاده شده است. در باندهای ۲، ۳، ۴ و ۵ لیپو پلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا با رقت ۵۰ میکرو گرم دیده می‌شود.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]



شکل۲: الکتروفورز فرکشن پروتئینی روی ژل ۱۵٪ و رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو. ستون های میانی با شماره‌های ۲ تا ۷ متعلق به فرکشن پروتئینی و ستونهای ۱و ۸ نشان دهنده مارکر پروتئینی فرمنتاس میباشد که نشان دهندهٔ وزن‌های از ۱۴ تا ۱۱۶ کیلو دالتون می‌باشد.

نتایج ایمنی‌زایی لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا در موشهای واکسینه شده و مواجهه با دوز کشنده از باکتری در جدول ۱ و نمودار ۱ نشان داده شده است. گروه‌های موشی واکسینه شده در مقایسه با گروه شاهد که دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون مورد مواجهه با دوز کشنده باکتری بیماری‌زا قرار گرفته‌اند ایمنی حفاظتی بالایی را نشان داده‌اند. منظور از علایم بیماری در گروه‌های موشی نشانه‌های ظاهری موش‌ها از جمله بی‌حالی و ضعف و کاهش اشتها پس از مواجهه می‌باشد. بعد از مواجهه درصد زنده ماندن موش‌ها در گروه واکسینه شده با فرکشن پروتئینی۸۶/۶۶٪ (درصد زنده ماندن موش‌های واکسینه شده پس از مواجهه) و در گروه واکسینه شده با لیپوپلی ساکارید ۷۳/۳۳٪(درصد زنده ماندن موش‌های واکسینه شده پس از مواجهه) می‌باشد.

جدول ۱ : نتایج ایمنی زایی گروه‌های موشی دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون با لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی

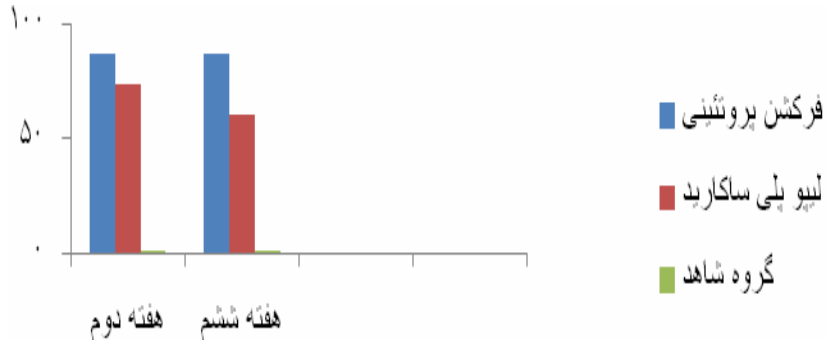
گروه‌های موشی مورد نظر	تعداد موش با علایم بیماری	تعداد مرگ و میر	تعداد موشهای زنده مانده	درصد تشخیص ایمنی‌زایی واکسن
گروه واکسینه با لیپوپلی ساکارید و مواجهه دو هفته پس از واکسیناسیون	٤	٤	۱۱	٪۷۳/۳۳
گروه واکسینه با فرکشن پروتئینی و مواجهه دو هفته پس از واکسیناسیون	۲	۲	۱۳	٪۸٦/٦٦
گروه شاهد و مواجهه دو هفته پس از واکسیناسیون	۱۵	۱۵	۰	٪۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

همچنین گروه‌های موشی واکسینه شده که شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون مورد مواجهه قرار گرفتند ایمنی حفاظتی را به میزان ٦٠٪ (درصد زنده ماندن موشهای واکسینه شده پس از مواجهه) در گروه واکسینه شده با لیپوپلی ساکارید و ٨٦/٦٦٪ (درصد زنده ماندن موشهای واکسینه شده پس از مواجهه) در گروه واکسینه شده با فرکشن پروتئینی نشان داده که نشانگر ایمنی حافظه‌ایی بلند مدت فرکشن پروتئینی لژیونلا پنوموفیلا در مقابل دوز کشنده این باکتری در مقایسه با لیپوپلی ساکارید این باکتری است است (جدول ۲ و نمودار ۱).

جدول ۲: نتایج ایمنی‌زایی گروه‌های موشی شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون با لیپوپلی ساکارید و فرکشن پروتئینی:

گروه‌های موشی مورد نظر	تعداد موش با علایم بیماری	تعداد مرگ و میر	تعداد موشهای زنده مانده	درصد تشخیص ایمنی‌زایی واکسن
گروه واکسینه با لیپوپلی ساکارید و مواجهه شش هفته پس از واکسیناسیون	۷	٦	۱۱	٦٠٪
گروه واکسینه با فرکشن پروتئینی و مواجهه شش هفته پس از واکسیناسیون	۲	۲	۱۳	٨٦/٦٦٪
گروه شاهد و مواجهه شش هفته پس از واکسیناسیون	۱۵	۱۵	۰	۰٪



نمودار ۱: درصد ایمنی‌زایی آنتی ژنهای فرکشن پروتئینی و لیپوپلی ساکارید در دو و شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون. گروه‌های شاهد هیچ نوع ایمنی‌زایی را در مواجهه با دوز کشنده باکتری نشان نداده و در صد ایمنی حفاظتی صفر می باشد

نتایج بررسی و مقایسه آماری نتایج به دست آمده از ایمنی زاسیون:

در آزمون مقایسهٔ نسبت دو جامعهٔ گروه واکسینه شده با فرکشن پروتئینی و با درصد ایمنی حفاظتی ٨٦/٦٦٪ با لیپوپلی ساکارید با درصد ایمنی حفاظتی ٧٣/٣٣٪، اختلاف معنی‌دار نبود (P>٠/٠٥). اما در مقایسهٔ ایمنی حفاظتی گروه‌های واکسینه شده با گروه

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

شاهد، اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). گروه‌های دوم واکسینه شده (مواجهه ۶ هفته پس از آخرین واکسیناسیون) نیز مورد آزمون مقایسه نسبت آماری قرار گرفته که طی این مقایسه، اختلاف معنی‌داری بین درصد ایمنی حفاظتی گروه‌های واکسینه شده مشاهده نشد اما اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد با ایمنی‌زایی صفر دیده شد (P<۰/۰۵).

بحث

با تخلیص فرکشن پروتئینی و لیپوپلی ساکارید به روش فنل داغ و تیمار آنزیمی و الکتروفورز این دو فرکشن روی ژل پلی آکریلامید نتایج تخلیص آنها مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج به دست آمده از الکتروفورز فرکشن پروتئینی نزدیک به ۱۰ باند پروتئینی با وزنهای مختلف جدا شدند. اکثر این باندهای تشکیل شده در محدودهٔ وزنی ۳۵ تا ۱۱۶ کیلو دالتون قرار دارند. یک باند پروتئینی در ناحیه وزنی ٦۰ کیلو دالتون مشخص شده است که بنابر مطالعات گذشته (۸)، مربوط به پروتئین شوک حرارتی می‌باشد. در ناحیهٔ وزنی ٤۰ کیلو دالتون یک باند پروتئینی مشاهده می‌شود که نشان دهندهٔ فلاژل لژیونلا پنوموفیلا است. در ناحیهٔ وزنی بین ۲۵ و ۳۵ کیلو دالتون یک باند پروتئینی دیده می‌شود که دارای پروتئین‌های سطحی ۲٤، ۲۵ و ۲۸ کیلو دالتونی لژیونلا پنوموفیلا می‌باشد. در نهایت در ناحیهٔ وزنی ۲۵ و ۱۸/٤ کیلو دالتونی یک باند پروتئینی مشاهده شد که این باند نیز احتمالاً دارای پروتئین ۱۹ کیلو دالتونی غشای خارجی است. در نهایت این نتایج نشان می‌دهد که فرکشن تخلیص شده در این مطالعه دارای انواع آنتی‌ژنهای پروتئینی متعلق به لژیونلا پنوموفیلا می‌باشد که هر کدام از این پروتئین‌ها توانایی تحریک سیستم ایمنی میزبان علیه این باکتری بیماری‌زا را دارند. نتایج به دست آمده از الکتروفورز لیپوپلی ساکارید نیز نشان داد که باندهای با حرکت سریعتر در انتهای ژل قرار گرفته‌اند و شامل مولکول‌های کوچکتر لیپید A و ساختارهای OPS (زنجیره جانبی-O) لیپوپلی ساکارید می‌باشند. باندهای با حرکت کندتر که در بالای ژل مشاهده می‌شوند در حقیقت شامل مولکول سالم و بدون شکستگی لیپوپلی ساکارید می‌باشند. نتایج ایمنی‌زایی موشهای گروه اول که دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون مورد مواجهه قرار گرفتند نشان می‌دهد که ایمنی به وجود آمده توسط فرکشن پروتئینی مؤثر بوده چنانکه بعد از مواجهه ۸٦/٦٦٪ موشهای واکسینه شده زنده مانده، همچنین این نتیجه در مورد گروه واکسینه شده با لیپوپلی ساکارید با ایمنی‌زایی به میزان ۷۳/۳۳٪ نیز دیده شد. این در حالی است که کل موشهای گروه شاهد کشته شدند. نتایج گروه دوم واکسینه شده‌ها که شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون مورد مواجهه قرار گرفتند نشان داد که ایمنی‌زایی توسط فرکشن پروتئینی در یک مدت طولانی مؤثر بوده چنانکه فقط دو سر موش (۸٦/٦٦٪) در مواجهه با دوز کشنده کشته شده‌اند، همچنین در گروه دوم موشی که لیپوپلی ساکارید به آنها تزریق شده بود میزان ایمنی‌زایی پس از شش هفته ٦۰٪ بوده است که نشان دهندهٔ یک ایمونوژن مناسب است. این نتایج در حالی است که کل گروه شاهد دوم نیز پس از مواجهه کشته شدند. با مقایسه نسبتهای آماری، اختلاف معنی‌داری بین دو مواجهه انجام شده برای گروه‌های واکسینه مشاهده نشد که این نشان دهندهٔ تأثیر ایمنی‌زایی واکسن‌های تولید شده در بلند مدت است. در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۸ توسط نومیستر و همکارانش بمنظور بررسی خاصیت اندو

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

توکسیک پایین لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا انجام گرفت، طی این مطالعه از کشت مونو مک ۶ برای ارتباط اندوتوکسیک بودن پایین لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا در حیوانات با اندازه گیری سایتو کاین‌های پیش التهابی تولید شده توسط این سلول‌های مونوسیت پس از تحریک انجام شد. در این مطالعه مشاهده گردید که برای فعال شدن سلول‌های مونو مک ۶ برای تولید سایتو کاین‌های پیش التهابی، غلظتی از لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا به میزان ۱۰۰۰ برابر بیش از غلظت لیپو پلی ساکارید باکتری‌های انتریک لازم است (۱۸). جرارد و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که هر چند لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا از لحاظ سمیت و تب‌زایی ضعیف‌تر از لیپوپلی ساکارید باکتری‌های انتریک است، اما یک محرک قوی برای سلول‌های ایمنی، شامل سلول‌های ماکروفاژی، دندریتیک و لنفوسیت‌ها می‌باشد (۱۹). با توجه به مطالعات گذشته که نشان داده اند لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا دارای اثرات تب‌زایی و اندوتوکسیکی پایینی است و همچنین با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه که نشان دهندهٔ تأثیر ایمنی‌زایی بالای لیپوپلی ساکارید این باکتری به میزان ۷۳/۳۳٪ در دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون و ۶۰٪ در شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون است، بنابراین می‌توان از لیپوپلی ساکارید این باکتری به عنوان یک ایمونوژن مناسب برای مطالعات بیشتر بمنظور تولید یک واکسن مؤثر علیه عفونت لژیونلا پنوموفیلا استفاده کرد. ماریا لوسیا ریکی در سال ۲۰۰۵ نشان داد که موشهای ایمن شده با فلاژل تخلیص شده لژیونلا پنوموفیلا به میزان ۱۰۰٪ در مواجهه با دوز کشندهٔ این باکتری زنده ماندند، همچنین این مطالعه نشان داده است که ماکروفاژهایی که به لیپوپلی ساکارید (LPS) لژیونلا پنوموفیلا مقاوم شده‌اند، توانایی تحریک و پاسخ به پروتئین فلاژلین این باکتری را دارند. در این مطالعه گروه‌های موشی به صورت داخل صفاقی واکسینه شده‌اند (۲۰). در مطالعه ما نیز از تزریق داخل صفاقی برای واکسیناسیون و مواجهه استفاده شد، همچنین ایمنی‌زایی واکسن فرکشن پروتئینی در مطالعه حاضر ۸۶/۶۶٪ بود که تقریباً نزدیک به نتیجه به دست آمده در مطالعه ریکی و همکارانش است. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۳ توسط بلاندر و هورویتز انجام شد، ایمنی‌زایی پروتئین‌های عمده سیتوپلاسمی لژیونلا پنوموفیلا که شامل: آنتی ژنهای غشایی و پروتئین‌های شوک حرارتی و هم چنین پاسخ ایمنی سلولی در خوکچه هندی به این آنتی ژنها مورد بررسی قرار گرفت. پس از واکسیناسیون و مواجهه با دوز کشنده لژیونلا پنوموفیلا از راه تنفسی، کل خوکچه‌های واکسینه شده پس از مواجهه زنده ماندند که تأثیر واکسن را به میزان ۱۰۰٪ نشان داد. در این مطالعه با آنالیز پروتئین‌های عمده سیتوپلاسمی با روش الکتروفورز نشان داده شده که این فرکشن از پروتئین‌های با وزن ۲۸، ٤٥ و ۶۵ کیلو دالتون تشکیل شده است، که پروتئین‌های با وزن ۲۸ کیلو دالتون متعلق به پروتئین‌های غشای خارجی و پروتئین‌های ۶۵ کیلو دالتون به عنوان پروتئین‌های غشای سیتوپلاسمی لژیونلا پنوموفیلا معرفی شده است (۲۱). مشابه با این بررسی در مطالعه حاضر نیز واکسیناسیون در ۳ زمان مختلف انجام شد. نتایج الکتروفورز فرکشن پروتئینی نیز نشان داد که این فرکشن دارای پروتئین‌هایی با وزن ۲۸ و ٦٥ کیلو دالتون می‌باشد که در آزمایشهای بلاندر به ترتیب به عنوان پروتئین‌های غشای خارجی و غشای سیتوپلاسمی لژیونلا پنوموفیلا معرفی شده است. در مطالعهٔ قبلی ما که از سلول کامل کشته شده به عنوان

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

واکسن استفاده شد، نتایج نشان داد که ایمنی‌زایی این واکسن دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون ۹۳/۳۳٪ و شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون۸۶/۶۶٪ بوده است (۹). در مقایسه با این مطالعه فرکشن پروتئینی دارای اثرات ایمنی‌زایی مشابهی با سلول کامل کشته شده داشته و ایمنی‌زایی بلند مدتی را ایجاد کرده است، چنانکه شش هفته پس از آخرین واکسیناسیون میزان ایمنی‌زایی این آنتی‌ژن در گروه‌های واکسینه شده کاهش نیافته است.

نتیجه‌گیری

این مشاهدات نشان می‌دهد که فرکشن پروتئینی و لیپوپلی ساکارید لژیونلا پنوموفیلا به ترتیب ایمونوژنهای مناسبی در بلند مدت بوده و همچنین کاندیداهای مناسب برای مطالعات بیشتر به منظور تولید یک واکسن مؤثر در برابر عفونت لژیونلا پنوموفیلا می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کمک و حمایت مدیر گروه ارشد میکروبیولوژی و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان انجام شده است. نویسندگان مقاله بدینوسیله تشکر و قدردانی خود را نسبت به این عزیزان ابراز می‌دارند.

References

1. BMW Diederen. Legionella spp.and Legionaires disease.British Infection Society 2007; 56: 1-12.
2. Maelle Molmeret, Dina M Bitar, Lihui Han, Yousef Abu Kwaik. Cell biology of the intracellular infection by Legionella pneumophila, Microbes and Infection. 2004; 6. 129-139.
3. Freedman AP, and SM. Katz. The prevalence of serum antibodies to Legionella pneumophila in patients with chronic pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 1981; 123: 238-9.
4. Friedman H, Yamamoto Y, Klein TW. Legionella Pneumophila pathogenesis and immunity. Semin Pediatr Infect Dis 2002; 13: 273-9.
5. Braedel-Ruoff S, Faigle M, Hilf N, Neumeister B, Schild H. Legionella pneumophila mediated activation of dendritic cells involves CD_{14} and TLR_2. J Endotoxin Res 2005; 11: 89-96.
6. Robey M, O'Connell W, Cianciotto NP. Identification of Legionella pneumophila rcp, a pag P-Like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection. Infect Immun 2001; 69: 4276-4286.
7. Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Engleberg NC. A mutation in the mip gene results in an attenuation of Legionella pneumophila virulence. Infect Immun 2001; 69: 4276-86.
8. Garduño RA, Faulkner G, Trevors MA, Vats N, Hoffman PS. Immunolocalization of Hsp60 in Legionella pneumophila. J Bacteriol 1998; 180: 505-13.
9. Motaharinia Y, Shapuri R, Rahnama M, Aliramaie MR, Rahmani MR, Rezaie MA. Isolation of Legionella pneumophila from environment and water system samples and evaluation of immuno-protective efficiency of its whole killed cell in mice model. Sci J Kurd Univ Med Sci; 2010, 15: 70-78.
10. B. Neumiester, M. Faigle, M. Sommer, U. Zähringer, F. Stelter, R. Menzel and et al. Low endotoxic potential of Legionella pneumophila lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. Infection and Immunity 1998; 4151-4157.
11. Hendry DFD, MJ Corbel, RA Bell and JA Stack. Brucella antigen production and standardization. Booklet2499. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.1985.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]

12. Reza Shapouri, Ashraf Mohabati Mobarez, Hojat Ahmadi, Bahman Tabaraie, Reza Hosseini Doust, Dariush Norozian. Optimization of Brucella abortus fermenter cultural conditions and LPS extraction method for antigen production. RJ of Microbiol 2008; 3: 1-8.
13. V Selvaraj, K Sampath and V Sekar.Extraction and characterization of lipopolysaccharide from Aeromonas hydrophila and its effects on survival and hematology of the Carp, Cyprinus carpio. Asian Fisheries Science 2004; 17: 163-173.
14. Tsal, C and CE Frasch. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anual Biochem 1982; 19: 115-119.
15. BD Hames. Gel electrophoresis of proteins. Oxford University Press 1998; 1-373.
16. Blander SJ, Horwitz MA. Vaccination with Legionella pneumophila membranes induces cell mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. Protective immunity independent of the major secretory protein of Legionella pneumophila. J Clin Invest 1991; 87: 1054-9.
17. Weeratna RDA, Stamler PH Edelstein, M Ripley T, Marrie D Hoskin, and PS Hoffman. Human and guinea pig immune responses to Legionella pneumophila protein antigens OmpS and Hsp60. Infect Immun 1994; 62: 3454-62.
18. Blander J, Horwitz A.Vaccination with the major secretory protein of L pneumophila induces cell-mediated and protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. J Exp Med 1989; 169: 691-705.
19. Girard RT, Pedron S, Uematsu V, Balloy M Chignard S Akira and R Chaby. Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. J Cell Sci 2003; 116: 293-302.
20. Ricci ML, Torosantucci A, Scaturro M, Chiani P, Baldassarri L, Pastoris MC. Induction of protective immunity by Legionella pneumophila flagellum in an A/J mouse model. Vaccine 2005; 23, 4811-4820.
21. Steven J Blander and Marcus A Horwitz. Major cytoplasmic membrane protein of Legionella pneumophila, a genus common antigen and member of the hsp 60 family of heat shock proteins, induces protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. J Clin Invest 1993; 91: 717-23.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-20]