مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل

دوره بیستم، شمارهٔ ۷، تیر ۱۳۹۷، صفحه ۵۴-۴۷

ایمنی زائی آنتی ژنهای نوترکیب سیستم ترشحی نوع ۳ و زیر واحد اتصالی سم شبه شیگا از باکتری E.coli O157 H7

مجتبی طاهری (BSc)[۱]، شهرام نظریان (PhD)[۲*]، فیروز ابراهیمی (PhD)[۲]، مصطفی بخش (PhD)[۳]، جواد فتحی (BSc)[۱]

۱-دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

۲-مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

۳-گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران، ایران

دریافت: ۹۶/۸/۲۳، اصلاح: ۹۶/۱۲/۲۳، پذیرش: ۹۷/۱/۶

خلاصه

سابقه و هدف: انتروهموراژیک *اشرشیاکلی* (EHEC) باعث اسهال و سندرم همولیتیک اورمیک می شود. با توجه به خطرات ناشی از درمان آنتی بیوتیکی در عفونت EHEC O157: H7، واکسن ها روشی امید بخش برای پیشگیری از عفونت را ارائه می کنند. هدف از این مطالعه بررسی ایمنی زایی پروتئین های نوترکیب EspA،Intimin وStx2b در برابر عفونت باکتری *E.coli* O157 H7 می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تحقیقی، بیان پروتئین های نوترکیب EspA،Intimin وStx2b در *E.coli* BL21 DE3 باIPTG القا شد. پروتئین های نوترکیب با وسترن بلات ارزیابی و کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. ایمنی زایی زیرپوستی و درون صفاقی موش ها انجام و تیتر آنتی بادی توسط ELISA تعیین شد. موشها باخوراندن باکتری آلوده و ریزش باکتری و مرگ و میر موش ها بررسی گردیدند.

یافته ها: آنالیز SDS-PAGE بیان پروتئین ها با وزن ۱۱،۱۷ و ۳۵ کیلودالتون را نشان داد. پروتئین های نوترکیب توسط وسترن بلات تایید شد. تیتر پایانی الیزا برای پاسخ هومورال به EspA، Intimin و Stx2b، ۲۵۶۰۰ بود. ریزش باکتری در موش های ایمن تا 10^{2} cfu/ml و مرگ و میر نیز تا ۶۰ درصد کاهش یافت.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که پاسخ ایمنی علیه پروتئین های EspA،Intimin وStx2b باعث حفاظت حیوان در چالش با *E.coli* O157: H7 می شود.

واژه‌های کلیدی: انتروهموراژیک *اشرشیاکلی*، توکسین شبه شیگا، سیستم ترشحی نوع ۳، پروتئین نوترکیب، ایمنی زایی.

مقدمه

سویه های بیماری زای باکتری *E.coli* پاتوژن های خطرناکی هستند که ابتلا به آنها آسیب‌های متعددی را برای بیمار ایجاد می کند (۲و۱). باکتری *E.coli* O157:H7 جزو دسته پاتوژن های EHEC محسوب می شود که از طریق فرآورده های غذایی آلوده و شیر غیرپاستوریزه به انسان منتقل می شود(۴و۳). سالانه بیش از ۵ میلیون مرگ و میر مخصوصا در کودکان زیر ۵ سال به واسطه آلودگی به این پاتوژن گزارش می شود(۵). با توجه به خطرات ناشی از درمان آنتی بیوتیکی در عفونتEHEC O157: H7، واکسن ها روشی امید بخش برای پیشگیری از عفونت را ارائه می‌کنند. سه شاخصه بیماری‌زایی اصلیEHEC شامل اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، حمله به سلول‌های اپیتلیال و اپیتلیوم، تولید توکسین است. باکتری پس از لانه گزینی در روده منجر به آسیب های شدیدی همچون کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic Colitis) و سندرم ادراری خونریزی دهنده (Hemolytic Uremic Syndrome) می شود(۷و۶). لانه گزینی این باکتری در لوله گوارش به واسطه عوامل و فاکتور هایی است که تحت کنترل جزایر پاتوژنیسیته می باشد. این جزایر دسته جات ژنتیکی خارج کروموزومی هستند و شامل عوامل بیماری زایی از قبیل ژن های تهاجم، اتصال و سیستم ترشحی می باشد(۷). توکسین شبه شیگلا (Stx) از یک زیرواحد مونومری آنزیمی StxA و زیرواحد پنج تایی متصل شونده به رسپتور StxB تشکیل شده است (۸). چسبندگی اولیه باکتری به سلول های اپی تلیال توسط پیلی تشکیل دهنده دسته (Bundle forming pilus) انجام می‌شود و توسط پلاسمید کد می شود. پروتئین EspA با شکل دادن یک کانال شرایط را برای انتقال سایر فاکتورهای دخیل در لانه گزینی باکتری فراهم می کند (۹). پروتئین غشایی intimin می باشد که جهت اتصال باکتری به سلول میزبان ضروری است (۱۰). متعاقب اتصال intimin به Tir باکتری EHEC به سطح سلول روده ای متصل شده و این اتصال موجب بازآرایی اسکلت سلولی اکتین در آن ناحیه می‌گردد (۱۰). EspA بر روی سطح باکتری ساختاری فیلامنی برای تزریق Tir، EspD و EspB تشکیل می دهد. تحقیقات نشان داده است که intimin به عنوان عامل کلیدی کلونیزاسیون جهت

* مسئول مقاله: دکتر شهرام نظریان

آدرس: تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست شناسی. تلفن:۷۷۱۰۴۹۳۴ -۰۲۱

E-mail: nazarian56@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]

[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]

اتصال EHEC به سلولهای میزبان می باشد(۹). Baranvand و همکاران با بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب StxB *شیگلا دیسانتری* تیپ یک در موش نشان دادند که این پروتئین باعث مقاومت موش در برابر *E. coli* O157:H7 می شود(۱۱). Salmanian و همکاران پروتئین های EspA-Intimin علیه باکتری *E. coli* O157:H7 بررسی کردند و نشان دادند که این پروتئین ها تا حدود زیادی مانع از عملکرد باکتری می شوند(۱۲). Kazemi و همکاران با استفاده از زیرواحد B سم شبه شیگا نوع ۲(Stx2B) و ایجاد ایمنی در حیوان آزمایشگاهی مشاهده کردند که سرم موش‌های ایمن، قادر به خنثی‌سازی سم می‌باشد و در آزمون چالش، حدود ۷۰ درصد موش‌های ایمن شده زنده ماندند (۱۳). Martorelli و همکاران مخلوط شامل پروتئین‌های نوترکیب Intimin، EspB و Stx2B را به‌عنوان کاندیدی جهت واکسن علیه *اشریشیاکلی* O157:H7 به کار بردند. ترکیب پروتئینی توانست سیستم ایمنی هومورال را به‌خوبی تحریک کند و همچنین سم Stx2B را خنثی کند(۱۴). بر اساس نتایج مطالعات انجام شده مشخص گردید که استفاده از راه کار مقابل با اتصال باکتری و همچنین عملکرد سم می تواند کارایی بالاتری علیه عفونت EHEC داشته باشد. هدف از این تحقیق، ارزیابی ایمنی زایی مخلوط پروتئین های نوترکیب زیرواحدهای اتصالی و توکسین (Stx2b، EspA، Intimin) از باکتری *E. coli* O157:H7 می باشد.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده: در این مطالعه تحقیقی از باکتری *E. coli* BL21-DE3 جهت بیان پروتئین نوترکیب استفاده شد. جهت انتخابی نمودن رشد باکتری واجد پلاسمید نوترکیب نیز از آنتی‌بیوتیک کانامایسین شرکت فرمنتاز استفاده شد. مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت‌های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمنتاز تهیه شد. آنتی بادی ضد هیستیدین از شرکت abcam خریداری شد. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل- نیتریلو استیک اسید (Ni-NTA) شرکت کیاژن استفاده شد.

بیان پروتئین‌های نوترکیب Intimin،EspA،Stx2b: پلاسمید های نوترکیب حاوی ژن‌های Intimin،EspA،Stx2b از مرکز تحقیقات زیست شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه و در میزبان *E.coli* BL21DE3 ترانسفورم گردید(۱۵). بیان پروتئین های نوترکیب در شرایط بهینه با استفاده از آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ ساعت القا گردید. عصاره سلول‌های بیانی بر روی ژل SDS-PAGE ۱۴ درصد مورد بررسی قرار گرفت(۱۷و۱۶).

تخلیص و تائید پروتئین های نوترکیب: برای تخلیص پروتئین‌ها از روش دناتوره استفاده شد. محلول رویی حاصل از شکست سلول ها از رزین گروماتوگرافی گذرانده شد. در هر مرحله خروجی ستون جداگانه جمع‌آوری و نگهداری گردید. در مراحل بعدی به ترتیب بافرهای شستشوی C (Tris- HCl،NaH_2PO_4؛ اوره با pH= ۶/۳)، D (pH= ۵/۹)، بافر استخراج E(pH= ۵/۴) و بافر دارای ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از ستون عبور داده شد(۱۸). به منظور بررسی روند تخلیص پروتئین‌ها از ژل SDS-PAGE ۱۴درصد استفاده شد. برای تایید پروتئین های نوترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد His-tag استفاده شد.

عصاره سلولی پس از بیان سه پروتئین با استفاده از سیستم لکه گذاری وسترن Bio-rad (Mini Protean) بر روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. پس از مسدود کردن نواحی آزاد با شیر خشک بدون چربی، کاغذ با رقت ۱/۱۰۰۰۰ آنتی بادی کانژوگه ضد هیستیدن مجاور شد. برای آشکارسازی از سوبسترای DAB (3'-Diaminobenzidine) استفاده و واکنش با آب مقطر متوقف گردید(۷).

ایمنی زایی و بررسی تیتر آنتی بادی: جهت بررسی ایمنی زایی از موش های سوری ماده با وزن تقریبا ۲۰ گرم که هیچ دارو یا واکسنی دریافت نکرده بودند، استفاده شد. به هر موش از گروه ایمن ۲۰ میکروگرم از مخلوط سه آنتی ژن به صورت زیر جلدی یا داخل صفاقی تزریق شد. یک هفته پس از تزریقات دوم، سوم، چهارم از موش ها خون گیری انجام و سرم جداسازی شده برای مراحل بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

به منظور بررسی تیتر آنتی بادی از روش الیزا استفاده گردید. برای هر چاهک ۵ میکروگرم از پروتئین های نوترکیب در بافر کوتینگ در نظر گرفته شد. مسدودکردن چاهک ها با PBST حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی انجام و در ادامه از رقت‌های ۱:۲۰۰ تا ۱:۲۵۶۰۰ سرم استفاده گردید. آنتی بادی گونژوگه موشی با رقت ۱:۲۰۰۰ به هر چاهک اضافه شد. پس از گرماگذاری برای آشکارسازی از سوبسترای OPD (o-Phenylenediamine Dihydrochloride) استفاده و واکنش با اسید سولفوریک متوقف و جذب نوری در ۴۹۵ نانومتر خوانده شد. مقایسه میانگین تیتر آنتی بادی حاصل از تجویز پروتئین‌ها در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم مقایسه شد. همچنین اثر روش تجویز زیر پوستی و درون صفاقی بر تیتر آنتی بادی نیز بررسی گردید.

بررسی ریزش باکتری در موش‌های ایمن با استفاده از باکتری *E. coli* O157:H7: دوهفته پس از خاتمه ایمن سازی، با استفاده از روش بررسی ریزش (shedding) باکتری چالش انجام شد. به این منظور ۴۸ ساعت قبل از شروع آزمون‌ها به آب موش‌ها آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین سولفات(۵ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه و ۱۲ ساعت قبل از شروع آزمون آب و غذای حیوانات موقتا حذف گردید. در ادامه به هر موش تعداد 10^{10} باکتری *E. coli* O157:H7 خورانده شد. نمونه مدفوع موش‌های کنترل و تست یک روز در میان به مدت دو هفته جمع آوری گردید. اندازه گیری ریزش مدفوعی باکتری *E. coli* O157:H7 طبق روش زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا میزان ۰/۱ گرم از مدفوع حیوان وزن شد و به آن یک میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB اضافه و تیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. رقت‌های متوالی از مایع رویی تهیه و بر روی محیط کشت اختصاصی سوربیتول مکانکی آگار (محتوی ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر تلوریت پتاسیم ۰/۰۵ میلی گرم در میلی لیتر سفکسیم) کشت داده و پلیت ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند در نهایت اقدام به شمارش کلنی‌های سفیدرنگ باکتری *E. coli* O157:H7 شد(۱۹).

بررسی زنده مانی موش های ایمن شده: ۱۴روز پس از آخرین مرحله ایمن سازی، موش های ایمن به سه گروه تقسیم شده و به هر گروه به ترتیب ۱۰ MLD، ۵۰ MLD و ۱۰۰ MLD از باکتری به صورت درون صفاقی تزریق شد. چنین روشی نیز برای موش های کنترل انجام شد. در طی مدت ده روز زنده ماندن موشها بررسی گردید.

بررسی آماری: داده ها با استفاده از آنالیز واریانس و انوای یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم و ریزش باکتری در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]

گروه غیر ایمن و گروه های ایمن شده با پروتئین کایمر با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت.

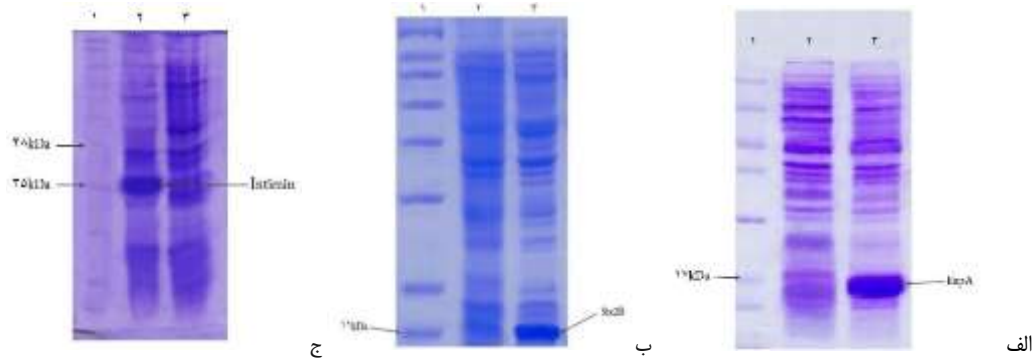
یافته ها

بیان و تخلیص پروتئین های نوترکیب EspA، Stx2B و Intimin: القاء بیان با IPTG منجر به تولید پروتئین های EspA، Stx2B و Intimin به ترتیب با وزن ۱۷،۱۱ و ۳۴ کیلودالتون شد (شکل۱). تخلیص هرکدام از پروتئین‌ها با ستون تمایلی نیکل انجام شد. پروتئین های نوترکیب در بافر ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار از ستون خارج شده و میزان خلوص پروتئین های EspA، Stx2B و Intiminبه ترتیب ۴۵، ۴۲ و ۳۲ درصد بود(شکل ۲).

بررسی تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های Intimin، Stx2B و EspA: تیتر پایانی الیزا برای پاسخ هومورال به EspA، Intimin و Stx2b، ۲۵۶۰۰ بود. آنتی بادی علیه هر سه جز پروتئینی تولید شد. تیتر آنتی بادی در رقت ۱:۲۰۰ سرم برای پروتئین های Intimin، Stx2B و EspA به ترتیب ۲/۶، ۲ و ۲/۸ بود (نمودار ۱). میانگین تیتر آنتی بادی علیه Stx2B کمتر از تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های Intimin و EspA بود ($p<۰/۰۵$). تیتر آنتی بادی علیه EspA بالاتر از Intimin بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی دار نبود. تفاوت تیتر آنتی بادی علیه هر کدام از پروتئین های نوترکیب Intimin، Stx2B و EspA در روش زیر پوستی و درون صفاقی تفاوت معنی داری را نشان نداد.

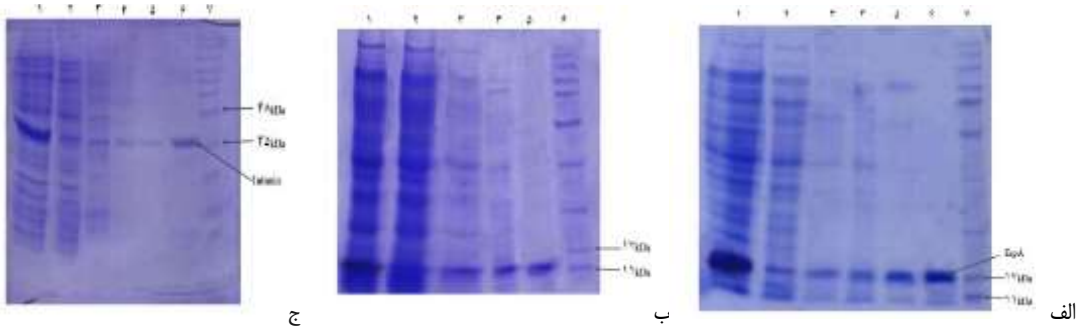
چالش موشهای ایمن: پس از چالش حیوان ها با باکتری *E.coli* O157:H7، موشهای غیرایمن، آلودگی را به صورت تقریبا پایدار نشان دادند در حالیکه در موشهای ایمن شده، آلودگی پس از یک هفته به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. میزان دفع باکتری در گروه های ایمن کاهش یافت. میزان دفع باکتری در حیوان کنترل پس از گذشت ۱۵ روز در حدود $۱۰^۸$ cfu/ml ثابت ماند. این در حالی بود که میزان دفع باکتری در موش های ایمن شده به روش زیر پوستی سیر نزولی داشته و در پایان روز ۱۵، به حدود $۱۰^۲$ cfu/ml کاهش داشت (نمودار ۲). موش‌های ایمن شده به روش صفاقی میزان دفع باکتری آنها در پایان روز ۱۵، حدود $۱۰^۳$cfu/ml بود. تفاوت ریزش باکتری در موش های کنترل با موش های ایمن شده به روش زیر پوستی و درون صفاقی از لحاظ آماری معنی دار بود($p<۰/۰۵$).

بررسی زنده ماندن موش‌های ایمن شده: با توجه به اینکه در بررسی میزان ریزش باکتری، موش های ایمن شده به روش زیر پوستی میزان دفع باکتری کمتری را نشان دادند لذا در این مرحله زنده مانی حیوانات فقط با حیوانات ایمن شده به روش زیر پوستی انجام شد. پس از چالش، ۱۰۰ درصد موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت ۱۰ MLD از باکتری، در طی مدت ۹ روز مردند. این در حالی بود که تمام موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند. ۱۰۰ درصد موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از دریافت ۵۰MLD از باکتری، در طی مدت ۶ روز مردند. این در حالی بود که ۸۰ درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند. موش‌های کنترل بعد از دریافت ۱۰۰ MLD از باکتری، در طی مدت ۵ روز مردند. در چنین شرایطی ۴۰ درصد موش‌های ایمن این دوز را تحمل کرده و زنده ماندند (نمودار ۳).



الف ب ج

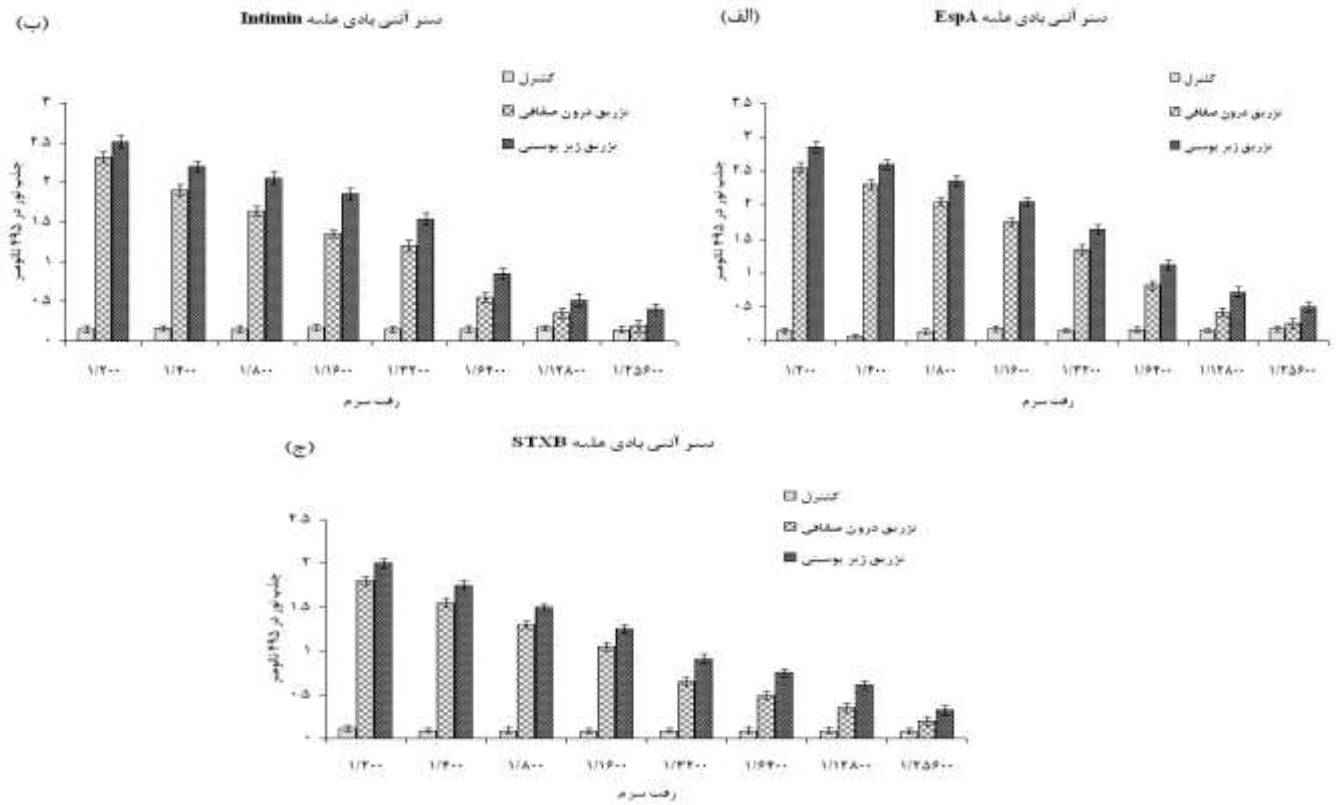
شکل۱. بررسی بیان پروتئین های نوترکیب EspA(الف)، Stx2B(ب) و Intimin(ج) بر روی ژل SDS-PAGE. ردیف ۱- نشانگر ملکولی پروتئین ، ردیف۲- نمونه القا نشده، ردیف ۳- نمونه القا شده با IPTG



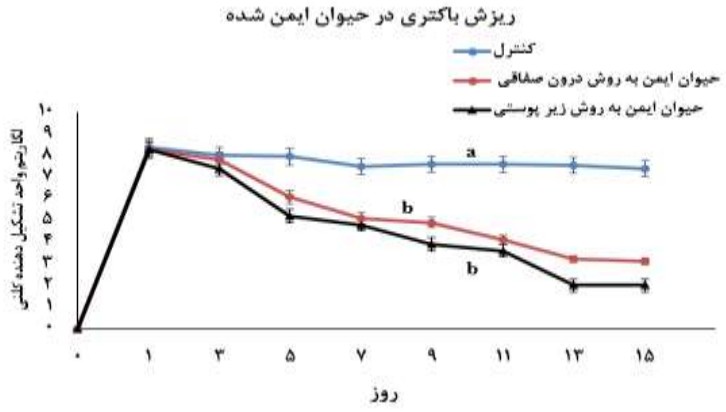
الف ب ج

شکل۲. بررسی تخلیص پروتئین های نوترکیبEspA (الف)، Stx2B(ب) و Intimin(ج) به روش دناتوره بر روی ژل SDS-PAGE . ردیف۱- نمونه قبل از عبور از ستون، ردیف۲- نمونه پس از عبور از ستون، ردیف۳- نمونه حاصل از شستشوی ستون با بافر C ردیف۴- نمونه حاصل از شستشوی ستون با بافر D، ردیف۵- نمونه حاصل از شستشوی ستون با بافر E، ردیف۶- نمونه حاصل از شستشوی ستون با ایمیدازول ۲۵۰

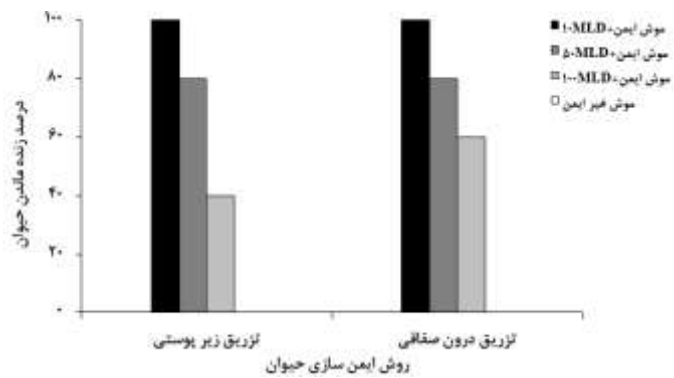
[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]



نمودار ۱. بررسی تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های EspA، Intimin و Stx2B به روش الیزا



نمودار ۲. بررسی ریزش باکتری در موش های ایمن شده به روش درون صفاقی ،زیر پوستی و موش‌های غیرایمن پس از چالش با ۱۰۹ باکتری *E.coli* O157:H7. حروف غیر همانند نشان دهنده تفاوت معنی داری است.



نمودار۳. نتایج زنده مانی موشهای ایمن شده در چالش با ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ MLD از باکتری *E.coli* O157:H7

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که پاسخ ایمنی علیه پروتئین های EspA، Intimin وStx2b باعث حفاظت حیوان در چالش با *E.coli* O157: H7 می شود. با توجه به سازوکار بیماری‌زایی *E.coli* O157:H7 نقش اساسی پروتئین‌های EspA و Intimin در آغاز فرآیند لانه گزینی باکتری و ناتوان کنندگی توکسین شبه شیگا مشخص می‌گردد. در تحقیق حاضر فاکتور های بیماری زای EspA، Intimin و Stx2B جهت ایجاد ایمنی علیه باکتری *E.coli* O157:H7 مورد استفاده قرار گرفت و توالی‌های نوکلئوتیدی دقیق کدکننده پروتئین‌های EspA، Intimin و زیرواحد B توکسین شبه شیگای ۲ از ژنوم باکتری *E.coli* O157:H7 استخراج شد. با بررسی منابع مشخص گردید که فقط بخش انتهای کربوکسیل پروتئین Intimin در برهم کنش آن با گیرنده اش نقش دارد، لذا ۹۳۳ نوکلئوتید انتهای ′۳ ژن *eae* که کد کننده این بخش بود انتخاب شد(۲۰). همچنین برای پروتئین EspA نیز به سبب اینکه ۱۲۸ باقیمانده انتهایی آن در سطح سلول باکتری قرار می گیرند(۲۱)، از ۶۴ اسیدآمینه ابتدایی آن صرف نظر شد. اما توالی کامل Stx2B در طراحی پروتئین نوترکیب مورد استفاده واقع شد.

مطالعات و پژوهش های زیادی در حوزه طراحی واکسن نوترکیب علیه پاتوژن EHEC با استفاده از فاکتورهای بیماری‌زای آن پرداختند. ازجمله این موارد می‌توان به پروتئین‌های *Stx2A*، *Stx1B*و*Stx2B* پروتئین‌های سیستم ترشحی نوع ۳، Intimin، EspA، Tir، ferric enterobactin protein (*FepA*) اشاره نمود(۲۲). در اکثرا مطالعات انجام شده، مشخص شد که آنتی‌ژن‌های EspA، Intimin و Stx2B نقش مهمی را در طراحی یک کاندید واکسن مناسب ایفا می‌کنند.Baranvand و همکاران با بررسی ایمنی زایی پروتئین نوترکیب StxB *شیگلا دیسانتری* تیپ یک در موش نشان دادند که این پروتئین باعث مقاومت موش در برابر *E. coli* O157:H7 می شود(۱۱). Salmanian و همکاران در ایمنی زائی پروتئین های EspA-Intimin نشان دادند که این پروتئین ها تا حدود زیادی مانع از عملکرد باکتری می شوند و بعد از گذشت دو هفته میزان ریزش باکتری از موش های ایمن شده به cfu ۱۰۳ کاهش یافت (۱۲). در تحقیق دیگری نیز Amani و همکاران ایمنی زائی پروتئین های EspA، Intimi و Tir را در موش بررسی کردند. در پژوهش مذکور بعد از ایمن سازی موش ها با پروتئین کایمر، میزان cfu۱۰۱۰ از طریق دهانی به موش تزریق شد و بعد از دو هفته میزان ریزش باکتری به صفر رسید (۹). اگر چه میزان ریزش باکتری به صفر رسید و نتیجه قابل قبولی داشت ولی نکته مهم در این تحقیق عدم توجه به فاکتور توکسین در طراحی کایمر آنها بود. Kazemi و همکاران با استفاده از زیرواحدB سم شبه شیگا نوع ۲(Stx2B) و ایجاد ایمنی در حیوان آزمایشگاهی مشاهده کردند که سرم موش‌های ایمن، قادر به خنثی‌سازی سم می‌باشد و در آزمون چالش، ۶۶ درصد موش‌های ایمن شده زنده ماندند(۱۳).

نتایج تحقیق Kazemi و همکاران با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. هر چند در پژوهش حاضر موشهای ایمن در مواجهه با ۱۰MLD از باکتری به طور کامل زنده ماندند. Martorelli و همکاران مخلوط شامل پروتئین‌های نوترکیب Intimin، EspB و Stx2B را به‌عنوان کاندیدی جهت واکسن علیه *اشریشیاکلی*O157:H7 به کار بردند. ترکیب پروتئینی توانست سیستم ایمنی هومورال را به‌خوبی تحریک کند و همچنین سم Stx2B را خنثی کند(۱۴). Martorelli و همکاران نشان داد که استفاده از مخلوط پروتئینی برای ایمن سازی حیوان، می تواند عملکرد اتصالی و توکسین باکتری را مختل نماید. هرچند که بر خلاف تحقیق حاضر، Martorelli فقط ایمنی زائی در شرایط درون آزمایشگاهی را بررسی نمود، با اینحال نتایج تحقیق مذکور با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. نتایج نشان داد که پاسخ ایمنی علیه پروتئین های Intimin، EspA وStx2b باعث حفاظت حیوان در چالش با *E.coli* O157: H7 می شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله ازکارشناسان آزمایشگاه دانشگاه جامع امام حسین(ع) جهت همکاری در تهیه مواد و تجهیزات مورد نیاز تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]

Immunization Evaluation of Type III Secretion System Recombinant Antigens and Shiga Like Toxin Binding Subunit of E. coli O157:H7

M. Taheri (BSc)[1], Sh. Nazarian (PhD)*[2], F. Ebrahimi (PhD)[2], M. Bakhshi (PhD)[3], J. Fathi (BSc)[1]

1.Faculty and Research Institute of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, I.R.Iran

2.Biology Research Center, Faculty and Research Institute of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, I.R.Iran

3.Nanobiotechnology group, Faculty and Research Institute of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(7); July 2018; PP: 47-54

Received: Nov 14th 2017, Revised: Mar 14th 2018, Accepted: Mar 26th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Escherichia coli* enterohemorrhagic (EHEC) causes diarrhea, hemolysis colitis, and uremic hemolytic syndrome. Due to the dangers of antibiotic treatment in the EHEC O157: H7 infection, vaccines offer a promising way to prevent infection. The purpose of this study was to investigate the immunity of recombinant proteins Intimin, EspA and Stx2b against infection of *E. coli* O157 H7.

METHODS: In this research study, expression of recombinant Intimin, EspA and Stx2b proteins *E.coli* BL21 DE3 was induced with IPTG. Recombinant proteins were examined by Western Blot and purified using the affinity Ni-NTA chromatography. Subcutaneous and intraperitoneally immunization of mice was performed and the antibody titer was determined by ELISA. The mice were orally infected with bacteria and the bacterial loss and mortality of the mice were examined.

FINDINGS: SDS-PAGE analysis showed expression of proteins with 11,17 and 34 kDa molecular weight. The recombinant proteins were confirmed by Western Blot. ELISA end point titer for humoral response to EspA, Intimin and Stx2b was 25600. The loss of bacteria in mice was 10^2 cfu / ml and mortality rate were reduced to 60 Percent.

CONCLUSION: The results showed that immune response against EspA, Intimin and Stx2b proteins protects animals against challenges using *E. coli* O157: H7.

KEY WORDS: *Enterohaemorrhagic Escherichia coli, Shiga like toxin, Type III secretion system, Recombinant protein, Immunization*

Please cite this article as follows:

Taheri M, Nazarian Sh, Ebrahimi F, Bakhshi M, Fathi J. Immunization Evaluation of Type III Secretion System Recombinant Antigens and Shiga Like Toxin Binding Subunit of E. coli O157:H7. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(7):47-54.

***Corresponding Author: Sh. Nazarian (PhD)**

Address: Biology Research Center, Faculty and Research Institute of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 77104934

E-mail: nazarian56@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]

[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]

References

1.Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic Escherichia coli among Iranian children. Jpn J Infect Dis. 2014;67(2):78-85.

2.Bakhshi M, Ebrahimi F, Nazarian S, Zargan J, Behzadi F, Gariz DS. Nano-encapsulation of chicken immunoglobulin (IgY) in sodium alginate nanoparticles: In vitro characterization. Biologicals. 2017;49:69-75.

3.Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of Escherichia coli O157: H7, toxigenic Vibrio cholerae, and Salmonella typhimurium by multiplex PCR. Arch Clin Infect Dis. 2009;4(2):97-103.

4.Saeedi P, Yazdanparast M, Behzadi E, Salmanian AH, Mousavi SL, Nazarian S, et al. A review on strategies for decreasing E. coli O157:H7 risk in animals. Microb Pathog. 2017;103:186-95.

5. Mirhoseini A, Amani J, Nazarian S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. Microbial Pathogenesis. 2018;117:162-169.

6.Cramer J. Enterohemorrahagic *Escherichia coli* (EHEC): Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). Emerg Infect Dis. Clinical Case Studies (Northem Germany). 2014:213-27.

7.Larrie-Bagha SM, Rasooli I, Mousavi-Gargari SL, Rasooli Z, Nazarian S. Passive immunization by recombinant ferric enterobactin protein (FepA) from *Escherichia coli* O157. Iran J Microbiol. 2013;5(2):113-9.

8.Gyles C. Shiga toxin-producing An overview. J Anim Sci. 2007;85(13-suppl):E45-62.

9.Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from espA, eae and tir genes of *Escherichia coli* O157: H7. Vaccine. 2010;28(42):6923-9.

10.Hosseini ZS, Amani J, Baghbani Arani F, Nazarian S, Motamedi MJ, Shafighian F. Immunogenicity of the nanovaccine containing intimin recombinant protein in the BALB/c mice. Clin Exp Vaccine Res. 2018;7(1):51-60.

11.Baranvand M, Honari H. Nasal immunogenicity induced by STxB and STxB-IpaD antigens in laboratory rats. Koomesh. 2015;16(3):397-403. [In Persian]

12. Saberi F, Salmanian AH, Amani J, Jafari M. Production of Chimeric Tir-intimin Protein from *E. coli* O157: H7 in the Tobacco (Nicotiana tobbacum) Plant and its Immunological Evaluation in an Animal Model. Modares J Med Sci. 2012; 15 (3):23-36.[In Persian]

13.Kazemi R, Akahavian TA, Jafari M, Amani J, Mousavi A, Hatef SA. Cloning and expression of the binding subunit of shiga-like toxin type 2 gene and immunization study in an animal model. Modares J Med Sci. 2016;18(4):45-60. [In Persian]

14.Martorelli L, Garbaccio S, Vilte DA, Albanese AA, Mejías MP, Palermo MS, et al. Immune Response in Calves Vaccinated with Type Three Secretion System Antigens and Shiga Toxin 2B Subunit of *Escherichia coli* O157: H7. PLoS One. 2017;12(1):e0169422.

15.Bakhshi M, Ebrahimi F, Zargan J, Nazarian S, Sheikhzade V. Cloning and Recombinant Expression of EspA as a Virulence Factor of *E.coli* O157: H7. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014;24(117):12-20.[In Persian]

16. Khalouie F, Mousavi SL, Nazarian S, Amani J, Pourfarzam P. Immunogenic evaluation of chimeric recombinant protein against ETEC, EHEC and *Shigella*. Mol Biol Res Commun. 2017;6(3):101-12.

17.Abdollahi M, Honari H, Nazarian SH. Subcloning and expression of SO6 gene, Saponaria Officinalis plant in *E.coli* and investigation of antibody titer in rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci, 2017; 24(12): 1024-33. [In Persian]

18. Nazarian S, Mousavi Gargari L. Immunogenicity Evaluation of PLGA Nanoparticles Contains Recombinant CfaB Protein from Enterotoxigenic *Escherichia Coli* . J Babol Univ Med Sci. 2017;19(9):39-44. [In Persian]

19.Cook S, Bach S, Stevenson S, DeVinney R, Frohlich A, Fang L, et al. Orally administered anti-*Escherichia coli* O157: H7 chicken egg yolk antibodies reduce fecal shedding of the pathogen by ruminants. Canadian J Anim Sci. 2005;85(3):291-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]

20.Frankel G, Candy D, Everest P, Dougan G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Citrobacter freundii, and Hafnia alvei. Infect Immun. 1994;62(5):1835-42.

21.Kühne SA, Hawes WS, La Ragione RM, Woodward MJ, Whitelam GC, Gough KC. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157: H7. J Clin Microbiol. 2004;42(7):2966-76.

22.Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. Advances in the development of enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. Vaccine. 2013;31(32):3229-35.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1397.20.7.7.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.7.47]