مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ٤: از ۱-۱۰
زمستان ۱۳۸۸

بررسی آثار حفاظتی آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلی سودوموناس آئروژینوزا بر عفونت سوختگی ناشی از آن در موش‌های BALB/c

محسن ارزنلو[۱]، مرتضی ستاری[۲*]، احمد زواران‌حسینی[۳]، سبحان فائزی[۱]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۶/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۹/۰۴

چکیده

هدف: سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت زخم و سپتی‌سمی در بیماران سوخته محسوب می‌شود. توسعه ایمنی‌درمانی به‌عنوان یکی از راه‌کارهای عملی برای مقابله با این باکتری محسوب می‌شود. فلاژل به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زایی باکتری، نقش مهمی در اتصال، حرکت، کموتاکسی و تحریک پاسخ ایمنی با واسطه TLR_5 دارد و از این رو به‌عنوان کاندید واکسن مطرح است. تهیه آنتی‌بادی ضد فلاژلین و بررسی آثار حفاظتی آن در مدل موش سوخته هدف اصلی این مطالعه است.

مواد و روش‌ها: در مرحله اول آنتی‌ژن‌های فلاژلی توسط اولتراسانتریفوژ تهیه شد. آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلی در خرگوش تولید و ناخالصی‌های آن توسط پدیده جذب جدا شد. اختصاصی بودن آنتی‌بادی‌های به‌دست آمده برای آنتی‌ژن‌های فلاژلی توسط آزمون‌های آگلوتیناسیون بررسی شد. پس از تعیین حداقل دوز کشندگی (LD_{50}) از سویه مد نظر، رقت‌های متفاوتی از آنتی‌سرم ضد فلاژلی برای انجام ایمنی‌زایی غیرفعال در موش‌های سوخته تزریق شد. میزان انتشار و پخش باکتری از محل سوختگی با بررسی کمّی تعداد باکتری‌ها در پوست و کبد تعیین شد. در این تحقیق علاوه بر سویه ATCC 27853 سودوموناس آئروژینوزا، سویه PA103 و یک ایزوله بالینی نیز برای آزمایش‌های آگلوتیناسیون استفاده شد.

نتایج: آنتی‌سرم H توانست در ۸۰ درصد موارد جلوی مرگ و میر موش‌های سوخته شده و چالش شده با سویه ATCC 27853 را بگیرد. همچنین شمارش تعداد باکتری‌های موجود در بافت کبد و پوست نشان داد که تعداد باکتری‌ها در بافت‌های موش‌های تحت آزمایش در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌دار کمتر است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلی سودوموناس با مهار تهاجم باکتری و اوپسونیزه کردن آن می‌توانند در برابر عفونت ناشی از زخم سوختگی اثر حفاظتی داشته باشد.

کلیدواژگان: سودوموناس آئروژینوزا، فلاژل، اولتراسانتریفوژ، سوختگی، آنتی‌بادی

۱- مقدمه

با وجود پیشرفت‌های زیادی که در درمان بیماران سوخته به‌وجود آمده است، هنوز هم سوختگی‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جوامع بشری محسوب می‌شود. یکی از مهم‌ترین عوارض مطرح در سوختگی‌ها، عفونت زخم

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه باکتری‌شناسی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: sattarim@modares.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

ناشی از آن است؛ به‌طوری که گفته می‌شود عفونت، عامل بیش از ۷۵ درصد مرگ و میرهای بعد از سوختگی است [۱]. طی چند دهه اخیر الگوی عفونت زخم‌های سوختگی تغییر پیدا کرده است. این مسئله شاید به دلیل ازدیاد مصرف آنتی‌بیوتیک‌های با طیف وسیع باشد. سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) به‌عنوان دومین بیماری‌زای بسیار رایج در جراحی‌ها و سومین باکتری مطرح در پزشکی است [۲]. سودوموناس آئروژینوزا باسیل گرم منفی فرصت طلبی است که با استفاده از عوامل ویرولانس (Virulence) متنوعی چون توکسین‌ها، آنزیم‌ها، فلاژل (Flagella)، لیپوپلی‌ساکارید، پیلی (Pili)، آلژینات (Alginate)، مولکول‌های تشخیص حدنصاب (Quorum sensing)، سیستم‌های ترشحی و ... [۳] در مبتلایان به بیماری‌های زمینه‌ای چون سیستیک فیبروزیس (Cyctic fibrosis)، عفونت‌های مزمن ریوی، برونشکتازی (Bronchectasie)، سوختگی، نئوپلازی (Neoplasie)، نوتروپنی (Neutropenie)، دیابت، ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) و ... عفونت‌های شدید و کشنده‌ای ایجاد می‌کند [٤، ٥]. ماهیت طبیعی و اکتسابی این ارگانیسم در مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های جدید باعث شده که محققین به‌دنبال روش‌های نوینی به‌منظور درمان و پیشگیری از عفونت‌های ناشی از این باکتری باشند. بنابراین از سال‌های ۱۹٦۰ تاکنون استفاده از روش‌های ایمونولوژیک براساس بیماری‌زایی و عوامل ویرولانس در کنار آنتی‌بیوتیک‌های جدید به‌عنوان یک روش مهم و اساسی مورد توجه بوده است [٦].

سودوموناس آئروژینوزا دارای یک فلاژل قطبی است که از واحدهای پروتئینی «فلاژلین» (Flagellin) تشکیل شده است. فلاژلین در این باکتری تنها دارای دو تیپ اصلی آنتی‌ژنی a و b است [۷، ۸]. ٦۰ درصد سویه‌ها دارای فلاژلین تیپ a و بقیه تیپ b هستند. تیپ b دارای یک سروتایپ، ولی تیپ a چندین سروتایپ دارد [۷]. اگرچه تیپ‌های a و b از نظر ساختار اولیه ژنومی ۳۵ درصد اختلاف دارند ولی بین فلاژلین همه سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا، هومولوژی بالا و واکنش متقاطع وجود دارد و این امر باعث شده که فلاژل به‌عنوان یک کاندید واکسن مطرح باشد [۸].

فلاژل باعث حرکت، کموتاکسی (Chemotaxis)، اتصال و کلونیزاسیون (Colonization) باکتری به سلول‌ها و مولکول‌های میزبان می‌شود [۹]. فلاژل و فلاژلین خالص شده می‌توانند به گیرنده‌های گلیکولیپیدی به‌ویژه GM_1 در اکثر غشاهای مخاطی متصل شوند [۹]. اخیراً نقش مهم فلاژل به‌عنوان عامل ایجاد پنومونی حاد (Acute pneumonia) و فلاژلین به‌عنوان عامل التهاب ریوی در عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا به اثبات رسیده است [۱۰] و مشخص شده که باکتری علاوه بر فلاژل، در طول مرحله رشد طبیعی و عفونت مقادیری فلاژلین ترشح می‌کند [۳]. فلاژلین با اتصال به گیرنده خود، TLR_5 (Toll-like receptor 5)، روی سلول‌های فاگوسیت و پوششی، باعث یک پاسخ التهابی قوی شامل ترشح اینترلوکین- ۸ (Interleukin-8: IL-8)، ماتریلیزین (Matrilysin)، بتا- دیفنسین (Bete-defensin) و غیره می‌شود [۳]. همچنین در فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسان التهابی، ترشح سایتوکین‌های (Cytokines) پیش‌التهابی و مهاجرت نوتروفیل‌ها نقش دارد و بدین ترتیب در ایجاد التهاب و عفونت حاد با فلاژل همکاری می‌کند [۳، ۱۱، ۱۲] و حتی در برخی از مطالعات از فلاژلین به‌عنوان ادجوانت (Adjuvant) استفاده شده است [۱۳]. تهیه و تولید آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلی سودوموناس آئروژینوزا و بررسی آثار حفاظتی آن در مدل موش سوخته در ایمنی‌زایی غیرفعال هدف اصلی این مطالعه است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه سویه سودوموناس آئروژینوزا و شناسایی آن

سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 از آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی دانشگاه علوم پزشکی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

شهید بهشتی تهیه و برای تأیید سویه مورد نظر از آزمون‌های اکسیداز، آرژنین دهیدرولاز، بررسی حرکت، اکسیداسیون گلوکوز در محیط OF، بررسی وجود فلاژل، رشد در دمای ۴۲ درجه و تولید رنگدانه استفاده شد [۱۴-۱۶].

۲-۲- تهیه آنتی‌ژن‌های فلاژلی

فلاژل سودوموناس آئروژینوزا براساس روش هولدر (Holder) تهیه شد [۱۷]. سویه مورد نظر توسط یک سواپ استریل، در محیط Trypticase Soy Agar (TSA) کشت داده شد و به‌مدت ۱۷ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مدت، کلونی‌ها به آرامی توسط یک پیپت پاستور استریل از روی محیط جمع‌آوری شد. بعد از جمع‌آوری، کلونی‌ها به درون لوله‌های پلاستیکی به حجم ۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده شد. سوسپانسیون به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه با g ۴۵۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و مایع رویی جدا شد. رسوب حاصل در بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH~ ۷) حل شد. برای جدا کردن فلاژل، سوسپانسیون باکتری (۶ گرم وزن مرطوب باکتری در ۱۰۰ سی‌سی بافر فسفات) به‌مدت ۱/۵ دقیقه با دور متوسط g ۲۵۰۰ توسط همزن لوله مخلوط شد. در مرحله بعد سوسپانسیون باکتری به‌دست آمده توسط سرنگ‌های ۳۰ سی‌سی به لوله‌های پلاستیکی ۳۶ میلی‌لیتری مخصوص اولتراسانتریفوژ انتقال داده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه با g ۱۶۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد توسط اولتراسانتریفوژ (Becman) سانتریفوژ شد. مایع رویی که عاری از باکتری و حاوی آنتی‌ژن‌های فلاژلی است جدا و دوباره به‌مدت ۳ ساعت در g ۴۰۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. بعد از پایان این مدت مایع رویی خالی شد و رسوب بسیار کوچکی که در ته لوله تشکیل شده بود در مقداری بافر فسفات حل شد و در حضور آب مقطر دیالیز شده و برای کارهای بعدی در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۳- تهیه آنتی‌سرم در خرگوش

برای تهیه آنتی‌سرم، ۱۰۰ میلی‌گرم از وزن مرطوب محلول پروتئین با ۰/۵ سی‌سی از محلول نرمال سالین و ۰/۵ سی‌سی از ادجوانت کامل فروند (Freund's complete adjuvant) مخلوط و چندین بار با فشار از درون سرنگ رد شد تا به حالت امولوسیون درآید. در این مطالعه چهار عدد خرگوش (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. خون غیرایمن قبل از تزریق آنتی‌ژن از خرگوش‌ها گرفته شد. آنتی‌ژن آماده شده در چهار نقطه متفاوت در پشت خرگوش (که غالباً در نزدیکی گره‌های لنفاوی است) تزریق شد. این روز به‌عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. همچنین ۱۰۰ میلی‌گرم از وزن مرطوب محلول پروتئین با ۰/۵ سی‌سی از محلول نرمال سالین و ۰/۵ سی‌سی از ادجوانت ناقص فروند مخلوط و به‌عنوان دوزهای یادآور در هفته‌های دوم و چهارم استفاده شد. خرگوش‌ها ۱۴ روز پس از هر دوز یادآور خونگیری شدند. در هر نوبت حدود ۲۵ سی‌سی خون از قلب خرگوش گرفته شد. سرم خون پس از نیم ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه و به دنبال سانتریفوژ تهیه و در دمای ۲۰- نگهداری شد [۱۸].

۲-۴- جذب آنتی‌سرم تهیه شده به‌منظور حذف آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی فلاژله

۲-۴-۱- تهیه آنتی‌بادی باکتریایی ضد فلاژله

برای برداشت آنتی‌بادی‌های غیر از آنتی‌بادی‌های فلاژلی، ابتدا رسوب حاصل از کشت باکتری در محیط BHI (Brain-Heart Infusion) با استفاده از سانتریفوژ در g ۴۲۰۰ و تحت ۴ درجه سانتی‌گراد جدا شد. بعد از شستشو با نرمال سالین و سانتریفوژ مجدد، رسوب باکتری به‌مدت ۲/۵ ساعت در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا آنتی‌ژن‌های فلاژلی از بین بروند [۱۸]. بعد از سانتریفوژ، رسوب حاصل حاوی جسم باکتری بدون فلاژل در نرمال سالین حاوی ۰/۳ درصد فرمالین

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

برای جلوگیری از رشد احتمالی باکتری‌های زنده حل و به‌مدت ۳ روز در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از این مدت، رسوب حاصل به‌وسیله سانتریفوژ جدا شد و پس از سه بار شستشو با سرم فیزیولوژی استریل و به حداقل رساندن فرمالین در محصول نهایی رسوب حاوی آنتی‌ژن‌های باکتریایی فاقد فلاژلین برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد [۱۸]. مقادیر زیادی ازآنتی‌سرم اولیه (آنتی‌سرم F)، برای جذب آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی ضد فلاژلین با مقادیر زیاد (۱ گرم وزن مرطوب) باکتری حرارت دیده فاقد فلاژله مخلوط شد تا آنتی‌بادی ضد فلاژله با خلوص بیشتری به‌دست آید (آنتی‌سرم H).

۲-۵- آگلوتیناسیون (Agglutination) و تیتراسیون آنتی‌سرم جذب شده

۲-۵-۱- تعیین نسبت‌های مطلوب غلظت آنتی‌ژن و آنتی‌سرم برای جذب آنتی‌بادی

برای به‌دست آوردن شرایط مطلوب واکنش آنتی‌سرم با آنتی‌ژن باکتریایی [برای جلوگیری از پدیده پروزون (Prozone)]، یک سی‌سی آنتی‌سرم با مقادیر ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ گرم وزن مرطوب سلول باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ دقیقه مجاور شد. پس از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و بیشترین آگلوتیناسیون به‌عنوان غلظتی از آنتی‌ژن باکتریایی که حداکثر جذب را نشان داد برای کارهای بعدی انتخاب شد.

۲-۵-۲- انجام آزمایش آگلوتیناسیون

ابتدا باکتری دارای فلاژله در محیط TSA تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و سوسپانسیونی از باکتری در محلول ۸/۵ درصد نمک طعام با جذب نوری معادل ۱ در طول موج ٦۰۰ نانومتر تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون با ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌سرم در درون میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤ ساعت قرار داده شد. بعد از این مدت یک قطره از آن در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. برای انجام تیتراسیون رقت‌های دوگانه (۱/۲ الی ۱/٤۰۹٦) از آنتی‌سرم تهیه و آخرین تیتری که آگلوتیناسیون داده بود، ثبت شد [۱۹].

۲-٦- بررسی قدرت بی‌حرکت‌سازی باکتری توسط آنتی‌سرم جذب شده (آنتی‌سرم H)

از روش ممانعت از گسترش کلونی روی محیط نیمه جامد استفاده شد. به این منظور از محیط نیمه جامد TSBA (Triptic Soy Blood Agar) و سویه استاندارد ATCC 27853 و یک ایزوله بالینی استفاده شد. به این ترتیب که باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای، هرکدام در دو نقطه از پلیت کشت داده شدند و یک فیلتر کاغذی آغشته به آنتی‌سرم ضد آنتی‌ژن‌های فلاژلی روی یکی از نقطه‌ها قرار داده شد و روی نقطه دیگر فیلتر کاغذی آغشته به سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شد. بعد از انکوباسیون به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای آزمایشگاه میزان پخش یا عدم پخش کلونی در اطراف فیلترها ارزیابی شد [۱۷].

۲-۷- مدل موش سوخته

از مدل سوختگی ایان آلن هولدر (Ian Alan Holder) برای ایجاد سوختگی استفاده شد [۲۰]. موش‌های مورد استفاده در این مطالعه از نوع BALB/c بودند که وزنی حدود ۲۲-٢٤ گرم داشته و از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. ابتدا ٢٤ ساعت قبل از سوختگی، پشت موش‌ها تراشیده شد. الگویی از ورق آلومینیومی در ابعاد ۱/۵×۱ اینچ طراحی شد. بعد از بیهوش کردن موش‌ها با زایموزین-کتامین (Zymosine-ketamine)، ناحیه عاری از مو با ۰/۵ سی‌سی اتانول ۹٦ درصد به‌مدت ۱۵ ثانیه سوزانده شد. بدین ترتیب ۳۰ درصد پشت موش متحمل سوختگی درجه دو می‌شود. بلافاصله حدود ۰/۵ سی‌سی سالین استریل به شکل زیرجلدی در ناحیه سوختگی، برای جبران آب

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

از دست‌رفته پوست تزریق شد. موش‌های سوزانده شده با این روش، نسبت به عفونت‌های کشنده سودوموناس آئروژینوزا شدیداً حساس بوده و حداقل دوز کشندگی در این حالت بسیار پایین است [۲۰].

۲-۸- تعیین حداقل دوز کشندگی (LD_{50}) سویه ATCC 27853

سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ در میلی‌لیتر) از باکتری در سرم فیزیولوژی تهیه شد و رقت‌های $۱۰^{۲}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ از آن تهیه شد. بعد از تقسیم موش‌ها به گروه‌های ۵تایی، از هر رقت ۱ سی‌سی با سواپ در محل سوختگی تلقیح شد. یک گروه به‌عنوان گروه شاهد تنها متحمل سوختگی شدند اما باکتری دریافت نکردند، که در این حالت موش‌ها در اثر سوختگی نمردند. برای اثبات مرگ اختصاصی موش‌ها بر اثر تلقیح باکتری، از نمونه‌های بافتی کالبدشکافی شده (Autopsy)، کشت میکروبی به‌عمل آمد.

۲-۹- ایمنی‌زایی غیرفعال

آثار درمانی آنتی‌بادی پلی‌کلونال (Polyclonal) ضد فلاژلی علیه عفونت سوختگی ناشی از سودوموناس آئروژینوزا توسط ایمنی‌زایی غیرفعال ارزیابی شد، بدین ترتیب که ابتدا موش‌های ماده ٦ تا ٨ هفته‌ای در ۵ گروه به‌ترتیب زیر قرار گرفتند: گروه اول سرم رقیق نشده، گروه‌های دوم و سوم به‌ترتیب سرم ۱/۳۲ و ۱/٦٤ رقیق شده و گروه چهارم به‌عنوان گروه کنترل تنها سرم خرگوشی غیرایمن و گروه پنجم نیز به‌عنوان گروه شاهد تنها سرم فیزیولوژی دریافت کردند. سرم‌ها بلافاصله پس از سوختگی و چالش، به‌عنوان یک عامل درمانی (ایمنی غیرفعال)، به‌صورت داخل صفاقی (Intra Peritoneal) در ناحیه‌ای دورتر از محل سوختگی تزریق شدند. حداقل ۷ موش برای هر گروه مورد آزمایش تعریف شد با توجه به مرگ‌های غیراختصاصی (مرگ زودتر از ۱۲ ساعت) محاسبات روی ۵ موش از هر گروه انجام شد.

۲-۱۰- بررسی تعداد باکتری‌ها در پوست و کبد

این بررسی در دو گروه انجام شد. در گروه آزمایش از سرم رقیق نشده استفاده شد و در گروه شاهد به جای آنتی‌سرم از سرم فیزیولوژی استفاده شد. ۲۸ ساعت بعد از تلقیح زیرپوستی باکتری در جایگاه سوختگی، موش‌ها قطع نخاع شده و پس از کشته شدن بلافاصله نمونه‌های کالبدشکافی از پوست و کبد تهیه شد. بعد از یکنواخت کردن بافت‌ها، چهار رقت ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰و ۱/۱۰۰۰۰ از سوسپانسیون اولیه (۱ گرم در میلی‌لیتر) در نرمال سالین استریل (۰/۹ درصد) تهیه شد و حدود ۰/۱ سی‌سی از آن‌ها روی محیط TSA انتقال داده شد. بعد از ۳٦ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلونی‌ها در یک گرم بافت تعیین شد [۲۱].

۲-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه نتایج بین گروه‌های متفاوت از آزمون آماری آنووا (ANOVA) استفاده و برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. P-value کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- شناسایی سویه ATCC 27853

با استفاده از یک‌سری آزمون‌های بیوشیمیایی مثل اکسیداز، حرکت، رشد در ٤۲ درجه سانتی‌گراد، آرژنین دهیدرولاز و تولید پیوسیانین (Pyocyanin) سویه ATCC 27853 تعیین هویت شد. رنگ‌آمیزی فلاژلین با نیترات نقره وجود فلاژل را در این سویه تأیید کرد. در ضمن حرکت سویه مد نظر در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد [۲۲، ۲۳].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

۳-۲- تعیین نسبت‌های مطلوب غلظت آنتی‌ژن و آنتی‌سرم برای جذب

نتایج نشان داد که غلظت ۰/۲۵ گرم وزن مرطوب باکتری کشته شده توسط حرارت در مقایسه با غلظت‌های ۰/۱۲، ۰/۵ و ۱ بهترین غلظت برای آگلوتیناسیون توسط آنتی‌سرم H است.

۳-۳- آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم جذب نشده (آنتی‌سرم F) و آنتی‌سرم جذب شده فلاژلی (آنتی‌سرم H)

آنتی‌سرم F شامل آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های فلاژلی و همچنین ضد آنتی‌ژن‌های بدنی (Somatic) است. نتایج آگلوتیناسیون با آنتی‌سرم F نشان داد که این آنتی‌سرم هم با سلول‌های زنده و هم با سلول‌های کشته شده توسط حرارت که فلاژل خود را از دست داده‌اند، آگلوتیناسیون می‌دهد. در این مطالعه علاوه بر سویه ATCC 27853، سویه PA103 و یک ایزوله بالینی مطالعه شد که نتایج حاصل در جدول ۱ آمده است. نتایج حاصل از آگلوتیناسیون آنتی‌سرم H نیز نشان داد که تنها سویه زنده ATCC 27853 با آن واکنش می‌دهد. سویه فاقد فلاژل (PA103) با آنتی‌سرم H واکنشی نداد که قابل پیش‌بینی بود. منفی بودن آگلوتیناسیون ایزوله بالینی با آنتی‌سرم H نیز به متفاوت بودن تیپ فلاژلین آن برمی‌گردد.

جدول ۱ بررسی آگلوتیناسیون سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با آنتی‌سرم F و آنتی‌سرم H

آنتی سرم	آگلوتیناسیون با ارگانیسم‌های مورد آزمایش					
	باکتری زنده			باکتری کشته شده با حرارت		
	ATCC 27853	PA103	ایزوله بالینی	ATCC 27853	PA103	ایزوله بالینی
آنتی سرم F	+	−	+	+	−	+
آنتی سرم H	+	−	−	−	−	−

۳-۴- بررسی ممانعت از حرکت در محیط نیمه جامد

نتایج نشان داد که آنتی‌سرم ضد آنتی‌ژن‌های فلاژلی قادر است جلوی گسترش کلونی در محیط را بگیرد. همچنین مشخص شد که آنتی‌سرم ضد آنتی‌ژن‌های فلاژلی تهیه شده تنها قادر است جلوی حرکت و گسترش کلونی سویه ATCC 27853 که آنتی‌ژن‌های فلاژلی به‌کار برده شده برای ایمن‌سازی، از آن تهیه شده بود را بگیرد و نتوانست جلوی گسترش سویه غیرمشابه ایزوله بالینی را بگیرد. این نتایج به‌همراه نتایج آگلوتیناسیون نشان داد که فلاژل در دو سویه ATCC 27853 و ایزوله بالینی از دو تیپ مختلف است.

۳-۵- حداقل دوز کشندگی سویه مورد مطالعه در موش سوخته

تعداد 10^8 باکتری توانست همه موش‌های سوزانده شده را در عرض ۷۲ ساعت بکشد. در همین مدت دوز 10^7 سه عدد و دوزهای 10^5 و 10^6 دو عدد از موش‌ها را از بین بردند. با محاسبه فراوانی مطلق و فراوانی تجمعی، LD_{50} سویه مورد مطالعه 10^7 در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از این آزمایش در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ توزیع فراوانی موش‌های سوخته مرده در اثر تلقیح باکتری ATCC 27853

شاخص	فراوانی مطلق	فراوانی تجمعی
10^8	۵	۵
10^7	۳	۸
10^6	۲	۱۰
10^5	۲	۱۲
10^4	۰	۱۲
10^3	۰	۱۲
10^2	۰	۱۲
۰	۰	۱۲

۳-۶- حفاظت در برابر عفونت سودوموناس آئروژینوزا توسط آنتی‌بادی‌های فلاژلی در زخم سوختگی

آزمایش‌ها نشان داد که آنتی‌سرم ضد فلاژلی اختصاصی است زیرا اولاً آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های غیرفلاژلی در حد بالایی در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

روش جذب آنتی‌سرم به‌وسیله باکتری کشته شده توسط حرارت، از آنتی‌سرم جدا شد و ثانیاً از حرکت و پخش کلونی در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) ممانعت شد. نتایج اثر محافظت‌کننده آنتی‌سرم H نشان داد که ۱۰۰ درصد موش‌ها در گروه کنترل که به‌جای آنتی‌سرم، سرم خرگوشی غیرایمن دریافت کرده بودند، مردند. موش‌هایی که سرم ۱/٦٤ دریافت کرده بودند، در ۱۰۰ درصد موارد در روز دوم از بین رفتند و همچنین این میزان مرگ و میر در تیمار ۱/۳۲ از سرم رقیق شده، در روز سوم رخ داد. گروهی که سرم رقیق نشده دریافت کردند در ۸۰ درصد موارد زنده ماندند و تنها ۲۰ درصد آن‌ها در روز چهارم هلاک شدند (جدول ۳).

جدول ۳ مقایسه میزان جلوگیری از مرگ و میر توسط رقت‌های مختلف آنتی‌سرم ضد فلاژله در موش سوخته

آنتی‌سرم ضد فلاژله (H)	دوز باکتری تلقیح شده	راه تلقیح باکتری	تعداد مرگ و میر بر حسب روز					درصد مرگ و میر
			۱	۲	۳	٤	٥	
سرم رقیق نشده	$۱/٥\times۱۰^{۸}$	موضعی	–	–	–	–	۱	۲۰ درصد
سرم ۳۲ بار رقیق شده	$۱/٥\times۱۰^{۸}$	موضعی	۲	۲	۱	–	–	۱۰۰ درصد
سرم ٦٤ بار رقیق شده	$۱/٥\times۱۰^{۸}$	موضعی	۲	۳	–	–	–	۱۰۰ درصد
سرم خرگوشی غیرایمن	$۱/٥\times۱۰^{۸}$	موضعی	٤	۱	–	–	–	۱۰۰ درصد
گروه شاهد (سوختگی بدون عفونت)	–	–	–	–	–	–	–	۰ درصد

۳-۷- ارزیابی تعداد باکتری‌ها در بافت‌های پوست و کبد

نتایج به‌دست آمده نشانگر آن بود که هر گرم پوست کالبدشکافی شده از موش‌های ایمن به میزان ٦/۷۸±۰/٥ باکتری بر پایه لگاریتمی و موش‌های غیرایمن به میزان ۷/٦±۰/٦٤ باکتری بر پایه لگاریتمی دارا بود که اختلاف آن‌ها از نظر آماری در سطح ٥ درصد معنی‌دار است. در مورد نمونه‌های کبد نیز بعد از کالبدشکافی و شمارش باکتری‌ها، گروه ایمن شده ۱/۰٥±۰/۲۳ باکتری بر پایه لگاریتمی و گروه غیرایمن به میزان ۲/۱۱±۰/۳ باکتری بر پایه لگاریتمی داشت که اختلاف آن‌ها نیز از نظر آماری در سطح ٥ درصد معنی‌دار بود (جدول ٤).

جدول ٤ مقایسه تعداد باکتری‌های موجود در بافت‌های موش‌های ایمن شده و ایمن نشده پس از کالبد شکافی

	تعداد موش‌های آزمایش شده	شمارش کمی *(log+SEM)	
		پوست	کبد
آنتی‌سرم H	٥	٦/۷۸±۰/٥	۱/۰٥±۰/۲۳
سرم خرگوشی غیرایمن	٥	۷/٦±۰/٦٤	۲/۱۱±۰/۳

*Geometric mean (log SEM)

٤- بحث

سودوموناس آئروژینوزا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت‌های بیمارستانی در طیف وسیعی از بیماران دارای ضعف ایمنی مثل سرطانی‌ها، مبتلایان به سیستیک فیبروزیس و سوختگی‌ها است. عوامل بیماری‌زایی این باکتری بسیار فراوان و یکی از مهم‌ترین آن‌ها فلاژل است که یک ایمونوژن (Immunogene) قوی است. در بررسی حاضر از آنتی‌ژن‌های فلاژلی برای واکسیناسیون فعال در مدل موش سوخته استفاده شد که قادر است میزبان را در برابر عفونت سودوموناسی حفاظت کند. اخیرا از این نوع روش درمانی در افراد مبتلا به سیستیک فیبروزیس نیز استفاده شده است [۱، ۲، ٤-٦، ۲٤]. از آن‌جایی که نتایج مناسبی از فرم فعال واکسیناسیون گرفته شده است می‌توان عنوان کرد که استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلی نیز می‌تواند حفاظت مناسبی در برابر عفونت‌های سودوموناسی داشته باشد. بعد از جدا نمودن فلاژل‌ها و تولید آنتی‌بادی علیه آن، نتایج آزمون‌های آگلوتیناسیون برای تأیید وجود آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلی (آنتی‌سرم H) نشان داد که آنتی‌سرم F یا جذب نشده به‌خوبی، هم با سلول‌های زنده و هم

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

سلول‌های کشته شده توسط حرارت واکنش می‌دهد و تیتر آن قبل و بعد از حرارت دادن سلول‌های باکتری تغییری ندارد. این نتایج نشان داد که آنتی‌سرم F علاوه بر آنتی‌بادی‌های ضد فلاژلی دارای ناخالصی‌های دیگر نیز هست. این یافته کاملاً با یافته‌های آنسرنگ (Ansrong) مطابقت داشت [۲۵]. نتایج آگلوتیناسیون بعد از جذب آنتی‌سرم F توسط سلول‌های کشته شده به‌وسیله حرارت نشان داد که آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی از سرم جدا شده‌اند؛ زیرا آنتی‌سرم جذب شده یا آنتی‌سرم H تنها با سلول‌های زنده واکنش می‌دهد. همچنین نتایج بررسی حاضر نشان داد که آنتی‌سرم H نمی‌تواند سلول‌های زنده را به‌خوبی آگلوتینه نماید که بتوان با چشم غیرمسلح مشاهده نمود، این مسئله ناشی از این است که آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه فلاژلین در خرگوش اغلب از نوع IgG هستند که یک آنتی‌بادی ناقص است. این عامل به‌همراه تک رشته‌ای بودن (Monotrichous) فلاژل سودوموناس آئروژینوزا باعث می‌شود که آگلوتیناسیون به‌خوبی مشخص نشود [۱۸، ۲۵]. فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا شامل دو تیپ اصلی a و b است. دانشمندان نشان داده‌اند که آنتی‌سرم علیه هرکدام از این تیپ‌ها، تنها سویه همولوگ خود را آگلوتینه می‌کند [٦، ۱۰، ۲٦]. نتایج این تحقیق نشان داد که آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنتی‌ژن‌های فلاژلی قادرند از حرکت باکتری در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند. در ضمن توانست قدرت بیماری‌زایی سویه مربوط را در مدل موش سوخته پایین آورد. در این تحقیق نشان داده شد که آنتی‌سرم H قادر است میزان مرگ و میر موش‌های ایمن شده را تا ۸۰ درصد پایین بیاورد.

با توجه به تیتر آنتی‌سرم H، تیمار سرم رقیق نشده بیشترین اثر حفاظتی را داشت که اختلاف آن با گروه کنترل در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. نتایج این تحقیق با نتایج درک (Drake) و مونیته (Montie) مطابقت داشت [۱۸]. جنبه دیگری که برای توجیه اثر حفاظتی آنتی‌بادی‌های فلاژلی می‌توان بیان نمود این است که آنتی‌سرم H با اوپسونیزه نمودن باکتری، باعث تسهیل فاگوسیتوز می‌شود؛ بنابراین باعث کشته شدن باکتری‌ها توسط فاگوسیت‌ها می‌شود در نتیجه تعداد کل باکتری‌ها کاهش می‌یابد [۲٦].

نتایج این تحقیق نشان داد، همان‌طور که آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا سویه ATCC 27853 در شرایط آزمایشگاهی توانست جلوی حرکت باکتری را بگیرد و مانع گسترش کلونی در محیط نیمه جامد شود، در شرایط داخل بدن (In vivo) نیز میزان مرگ و میر موش‌های سوخته و آلوده شده با باکتری را پایین آورد و مانع از گسترش باکتری به کبد حیوان شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن فلاژلین سودوموناس موجب مهار تهاجم باکتری و انتشار آن از بافت سوخته به سایر اندام‌ها می‌شود.

۵- تشکر وقدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که حمایت مالی این طرح را در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد بر عهده داشته است تقدیر و تشکر می‌شود.

٦- منابع

[1] Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171(11): 1209-23.

[2] Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends Microbiol 2004; 12(11): 509-17.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

[3] Cobb LM, Mychaleckyj JC, Wozniak DJ, López-Boado YS. Pseudomonas aeruginosa flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. J Immunol 2004; 173(9): 5659-70.

[4] May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK. Alginate synthesis by Pseudomonas aeruginosa: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev 1991; 4(2): 191-206.

[5] Maschmeyer G, Braveny I. Review of the incidence and prognosis of Pseudomonas aeruginosa infections in cancer patients in the 1990s. Eur J Clin Microbiol Infec Dis 2000; 19(12): 915-25.

[6] Holder IA. Pseudomonas immunotherapy: a historical overview. Vaccine 2004; 22(7): 831-9.

[7] Allison JS, Dawson M, Drake D, Montie TC. Electrophoretic separation and molecular weight characterization of Pseudomonas aeruginosa H-antigen flagellins. Infect Immun 1985; 49(3): 770-4.

[8] Spangenberg C, Heuer T, Bürger C, Tümmler B. Genetic diversity of flagellins of Pseudomonas aeruginosa. FEBS Lett 1996; 396(2-3): 213-7.

[9] Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. Role of flagella in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection. Infect Immun 1998; 66(1): 43-51.

[10] Balloy V, Verma A, Kuravi S, Si-Tahar M, Chignard M, Ramphal R. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by Pseudomonas aeruginosa. J Infect Dis 2007; 196(2): 289-96.

[11] Steiner TS. How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. Infect Immun 2007; 75(2): 545-52.

[12] Salazar-Gonzalez RM, McSorley SJ. Salmonella flagellin, a microbial target of the innate and adaptive immune system. Immunol Lett 2005; 101(2): 117-22.

[13] Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with Yersinia pestis. Infect Immun 2006; 74(2): 1113-20.

[14] Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL. Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from Escherichia coli and Pseudomonas. Mol Microbiol 2002; 45(5): 1177-90.

[15] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrock-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000; 406(6799): 959-64.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]

[16] Naderi N, Rashed MT, Nazem M. Experimental Bacteriology. Emam Reza publication, Mashhad, 1996; p: 195-200.

[17] Holder IA, Wheeler R, Montie TC. Flagellar preparations from Pseudomonas aeruginosa: animal protection studies. Infect Immun 1982; 35(1): 276-80.

[18] Drake D, Montie TC. Protection against Pseudomonas aeruginosa infection by passive transfer of anti-flagellar serum. Can J Microbial 1987; 33(9): 755-63.

[19] Rosok MJ, Stebbins MR, Connelly K, Lostrom ME, Siadak AW. Generation and characterization of murine antiflagellum monoclonal antibodies that are protective against lethal challenge with Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 1990; 58(12): 3819-28.

[20] Stieritz DD, Holder IA. Experimental studies of the pathogenesis of infections due to Pseudomonas aeruginosa: description of a burned mouse model. J Infect Dis 1975; 131(6): 688-91.

[21] Stover GB, Drake DR, Montie TC. VVirulence of different Pseudomonas species in a burned mouse model: tissue colonization by Pseudomonas cepacia. Infect Immun 1983; 41(3): 1091-104.

[22] Moazeni SM. Burn effects on body immune system. Drug Treat J 1990; 85: 20-32.

[23] Finegan SM, Smith RA. Enhanced staining of bacterial flagella using aged mordant in the silver stain. Biotech Histochem 1994; 69(4): 199-202.

[24] Landsperger WJ, Kelly-Wintenberg KD, Montie TC, Knight LS, Hansen MB, Huntenburg CC, Schneidkraut MJ. Inhibition of bacterial motility with human antiflagellar monoclonal antibodies attenuates Pseudomonas aeruginosa-induced pneumonia in the immunocompetent rat. Infect Immun 1994; 62(11): 4825-30.

[25] Ansorg RA, Knoche ME, Spies AF, Kraus CJ. Differentiation of the major flagellar antigens of Pseudomonas aeruginosa by the slide coagglutination technique. J Clin Microbial 1984; 20(1): 84-8.

[26] Bonfiglio G, Laksai Y, Franchino L, Amicosante G, Nicoletti G. Mechanisms of beta-lactam resistance amongst Pseudomonas aeruginosa isolated in an Italian survey. J Antimicrob Chemother 1998; 42(6): 697-702.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-01-30]