

کاندید واکسن بر پایه‌ی نانوذله کیتوسانی علیه باکتری EHEC

مهدی عظیم بیک^۱، دکتر سید لطیف موسوی گرگری^۲، دکتر شهرام نظریان^۳

نویسنده‌ی مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شاهد، تهران
slmousavi@shahed.ac.ir

دریافت: ۹۵/۳/۹ پذیرش: ۹۵/۶/۱

چکیده

زمینه و هدف: اشریشیا کلی انتروهموراژیک (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*) عامل بیماری اسهال و کولیت هموراژیک در انسان می‌باشد. اولین مرحله برای عفونت زایی، اتصال EHEC از طریق پروتئین ایتیمین به سلول‌های اپیتلیال روده‌ای می‌باشد که پروتئین ایتیمین نقش کلیدی را در این محله بازی می‌کند. ایمونوژن در برگرفته‌ی پروتئین ایتیمین می‌تواند اتصال EHEC را مهار و از اسهال جلوگیری کند. انکپسولاسیون آنتی ژن‌ها در حامل‌های خاص از قبیل نانوذله‌های کیتوسانی، نه تنها آنها را در برابر عوامل محیطی محافظت کرده بلکه غلظت‌های مناسب از آنتی ژن را در محیط فراهم کرده و فعالیت زیستی را افزایش می‌دهد. هدف از این تحقیق بررسی ایمنی زایی نانوذله‌های کیتوسانی بارگذاری شده با پروتئین علیه EHEC بود.

روش بررسی: پروتئین در *E. coli* بیان و تخلیص شد. نانوذله‌های کیتوسانی از طریق میانکنش کیتوسان با تری پلی فسفات (TPP) به‌عنوان یک اتصال دهنده متقاطع تهیه شدند. نانوذله‌ها با ایتیمین بارگذاری و خصوصیات ساختاری آنها با SEM و DLS بررسی گردید. نانوذله‌ها و پروتئین‌های محلول به ترتیب از مسیر خوراکی و تزریقی به موش‌های Balb/C انتقال یافتند. تیتراژ آنتی‌بادی‌ها با روش الیزا تعیین شد. گروه‌های موش ایمن و غیر ایمن با باکتری *E. coli* O157:H7 مورد چالش شدند.

یافته‌ها: ظرفیت بارگذاری نانوذله‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، ۱۰۰ درصد بود. متوسط اندازه‌ی نانوذرات ۲۱۸ نانومتر بود. ایمن سازی موش‌ها القای پاسخ آنتی بادی IgG سرمی را القا کرد.

نتیجه‌گیری: حفاظت بخشی موش‌های ایمن شده از مسیر خوراکی بهتر از مسیر تزریقی بود.

واژگان کلیدی: نانوذله، کیتوسان، *E. coli* O157:H7، ایتیمین، ایمونوژن

مقدمه

شیوع اسهال ناشی از سویه‌های اشریشیاکلی در سراسر جهان به ویژه در مناطقی که از سطح بهداشت پایین‌تری برخوردارند، بسیار بالا است. اشریشیاکلی‌های مولد اسهال، بر اساس تفاوت‌های آنتی ژنی و سازوکار بیماری‌زایی به ۶ گروه	انترواگرگیتیکو (EAEC)، انتروهموراژیک (EHEC)، انترواینویسیو (EIEC)، انتروپاتوژنیک (EPEC)، انتروتوکسیژنیک (ETEC) و ادیرنت انتشار یابنده (DAEC) تقسیم می‌شوند (۱ و ۲). اشریشیاکلی انتروهموراژیک
---	--

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، استاد گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران

۳- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران

(۱۴). پاتوژن‌های A/E یک جزیره بیماری‌زایی به نام LEE دارند که کد کننده پروتئین‌های لازم جهت سرهمبندی یک نوع سیستم ترش‌حی نوع III(T3SS) می‌باشد (۱۳). T3SS که در پاتوژن‌های A/E یافت می‌شود، ترکیبی است از یک ساختار پایه که شامل هر دو غشای باکتری و یک ساختار سوزن مانند که از تکرارهای واحدهای پروتئینی EspA و EscF تشکیل شده است. در قسمت نوک ساختار، پروتئین‌های EspB و EspD یک سوراخ در سلول اپیتلیال ایجاد می‌کنند که از میان آن پروتئین‌های جا به جا شونده انتقال می‌یابند (۱۵). پروتئین‌های انتقال یابنده نوع III افکتور نامیده می‌شوند و پیشنهاد شده است که ژنوم EHEC بیش از ۵۰ پروتئین از این نوع را کد می‌کند که ژن‌های آن‌ها در جزیره بیماری‌زای LEE یا در کروموزوم باکتری قرار دارند (۱۶). Tir یکی از اولین پروتئین‌های انتقال یابنده در طول عفونت است که در غشای انتروسیت متمرکز شده و به عنوان یک گیرنده برای اینتیمین (پروتئین غشای خارجی EHEC) عمل می‌کند (۱۷). اینترکشن Intimin-Tir باکتری را به سطح سلول میزبان چسبانده و موجب بازآرایی اسکلت سلولی جهت تشکیل ساختار پایه مانند اکتینی می‌گردد (۱۸). بنابراین Tir و Intimin پروتئین‌هایی هستند که برای سرهمبندی و عملکرد T3SS لازم بوده و در ویروالانس EHEC ضروری هستند (۱۹ و ۱۰).

به دلیل این که محل اتصال، تکثیر و تهاجم باکتری EHEC، مخاط روده می‌باشد بنابراین القای آنتی‌بادی‌های مخاطی علیه این پروتئین‌ها می‌تواند اولین مرحله‌ی ورود باکتری را مختل کند (۲۰).

مزیت مهم واکسیناسیون مخاطی، تولید آنتی‌بادی‌های موضعی در مکان‌هایی است که پاتوژن وارد بدن می‌شود. واکسیناسیون می‌تواند خنثی سازی پاتوژن‌ها را در زمانی که عوامل بیماری‌زا از راه مخاط وارد بدن می‌شوند، فراهم می‌سازد. همچنین به دلیل عدم نیاز به تزریق و پروسه‌ی استریل سازی،

(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*) از پاتوژن‌های حیوان دوست روده‌ای می‌باشد که در دنیا به صورت تک گیر شیوع دارد. EHEC نوعی/شریشیالکی تولید کننده‌ی شیگا توکسین (STEC) است که در روده‌ی انسان کلونیزه شده و موجب بیماری اسهالی می‌شود و می‌تواند باعث کولیت خونریزی دهنده (Hemorrhagic colitis) شده و در برخی موارد، نشانگان خونریزی دهنده‌ی ادرار (Hemolytic Uremic Syndrome) ایجاد کند (۶-۳). کودکان کمتر از ۵ سال و افراد مسن بیشترین حساسیت را نسبت به ابتلا به نشانگان خونریزی دهنده ادرار دارند. حدود ۴۵۰ سروتیپ STEC از انسان‌های مبتلا جداسازی شده است (۷) که از میان آنها ۱۰ سروگروپ مسئول بیشترین موارد بیماری هستند. در بیشتر کشورها، سروتیپ O157:H7 غالب‌تر بوده و با شیوع بیماری ارتباط دارد (۸). گرچه اولین گزارش‌ها مربوط به جوامع غربی است، اما آلودگی به این باکتری محدود به این کشورها نشده و پراکندگی آن در سراسر جهان از جمله ایران نیز گزارش شده است. در ایران عمده این آلودگی‌ها مربوط به گوشت و شیر آلوده بوده است (۹). گاوها و سایر نشخوارکنندگان به عنوان مخزن برای این پاتوژن هستند و ریزش باکتری از مدفوع با آلودگی منابع غذایی ارتباط دارد (۱۰). مطالعات در کشورهای با خطر شیوع بالا تایید می‌کند که کمتر از ۱ درصد تا بیش از ۳۰ درصد گاوها باکتری را حمل می‌کنند (۱۱). دوز عفونت‌زای باکتری O157:H7 هم در گوساله و هم در انسان پایین است. در بعضی موارد تقریباً فقط ۱۰^۲ ارگانیسم جهت ایجاد عفونت کافی می‌باشد (۱۲).

EHEC پاتوژن روده‌ای است که قابلیت تشکیل ضایعات Attaching/Effacing:A/E (اتصال و محو شدن) در اپیتلیوم روده‌ی انسان را داراست (۱۳). این ضایعات با اتصال باکتری و تشکیل ساختار پایه مانند اکتینی شروع شده و منجر به تخریب میکروویلی‌های سلول‌های انتروسیت روده می‌گردد

در پلاسمید pET 32a موجود بود در *E.coli* BL21(DE3) بیان و سپس تخلیص گردید. نانوذله کیتوسان - TPP تهیه و با پروتئین‌های تخلیص شده بارگذاری شد. نانوذله‌های بارگذاری شده با پروتئین اینتیمین به موش‌های آزمایشگاهی خوراندند شدند. به گروه دیگری از موش‌ها پروتئین اینتیمین خالص به روش زیر جلدی تزریق شد. ارزیابی آنتی‌بادی‌ها با روش ELISA و چالش موش‌های ایمن شده، با باکتری اشریشیاکلی O157:H7 صورت گرفت.

روش بررسی

مواد و حیوان آزمایشگاهی: در این مطالعه‌ی تجربی، برای بیان پروتئین نوترکیب از میزبان *E.coli* BL21-DE3 و جهت رشد آن، از محیط‌های کشت LB مایع و آگار استفاده گردید. مواد شیمیایی و نشانگر وزن مولکولی پروتئین از شرکت‌های مرک و فرمتاز تهیه شد. ستون افینیتی کروماتوگرافی Ni-NTA از شرکت کیاژن و کیسه‌ی دیالیز از شرکت سیگما خریداری شدند. ادجوانت ناقص و کامل فروند از انستیتو رازی تهیه شد. آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP علیه ایمونوگلوبین G موشی و آنتی‌بادی موشی علیه His-tag از شرکت Abcam خریداری شد. کیتوسان با وزن مولکولی متوسط از شرکت Sigma-Aldrich و سدیم تری پلی فسفات از شرکت Scharlau تهیه شد. موش‌های نر Balb/C از انستیتو رازی تهیه شدند و روش نگهداری آن‌ها مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شد.

بیان ژن اینتیمین: به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت LB جدید حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک آمپی سیلین به اندازه یک درصد حجمی از کشت شبانه سلول‌های BL21-DE3 حاوی سازه pET32a-intimin تلقیح و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در حالت به هم زنی انکوبه شد. پس از آن که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷ رسید، بیان ژن اینتیمین با افزودن IPTG

قیمت‌ها را کاهش داده و پذیرش واکسن توسط بیمار را افزایش می‌دهد. اما از آنجا که واکسن‌ها به تنهایی پس از تجویز مخاطی به مقدار کافی جذب نمی‌شوند، نیاز به تجویز همزمان با افزایش دهنده‌های جذب، ادجوانت‌ها و گاهی انکپسوله شدن در ذرات را دارند (۲۱). انکپسوله کردن آنتی‌ژن‌های پلی‌پپتیدی در نانو و میکروذرات به‌عنوان یک استراتژی جهت افزایش ایمنی‌زایی، به‌صورت گسترده‌ای پیگیری می‌شود. به دام انداختن آنتی ژن‌ها در ذرات می‌تواند از تجزیه شدن آن جلوگیری کرده و پایداری آنتی ژن را افزایش دهد. به علاوه، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک، هنگامی که ذرات اندازه‌ای بین ۱۵۰ نانومتر تا ۴/۵ میکرومتر دارند، به سهولت می‌توانند آن‌ها را فاگوسیتوز و عمل آوری کنند (۲۲). همچنین سیستم‌های ذره‌ای می‌توانند طوری مهندسی شوند که شامل ادجوانت‌های اضافی باشند، تا بتوانند ایمنی‌زایی را تقویت کنند (۲۳).

مطالعات نشان داده که فرمولاسیون‌های بر پایه بیوپلیمر کیتوسان در افزایش جذب پروتئین‌های دارویی و نیز القای آنتی بادی‌ها پس از واکسیناسیون مخاطی عملکرد موفقیت آمیزی داشته اند (۲۴ و ۲۵). کیتوسانیک پلیمر ارزان، زیست سازگار، با قابلیت تجزیه بیولوژیک و قابل اتصال به لایه‌های مخاطی و یک پلیمر غیر سمی با منشاء طبیعی است (۲۶). سیستم‌های میکرو و نانو ذره‌ای کیتوسان برای تسهیل در انتقال ژن‌ها، پروتئین‌ها و آنتی ژن‌ها در حال پیشرفت می‌باشند (۲۷). میکرو و نانوذرات به وسیله‌ی میانکشی‌های الکتروستاتیک بین گروه‌های آمین کیتوسان و یک ماده پلی‌انیونی زیست سازگار نظیر تری پلی فسفات (TPP) به سادگی قابل تهیه هستند (۲۸). اتصال متقاطع کیتوسان با TPP موجب کنترل رهایش داروهای آنتی ژن از ذرات ایجاد شده می‌گردد (۲۹).

در تحقیق حاضر به منظور ایجاد ایمنی مخاطی از مسیر خوراکی ابتدا پروتئین اینتیمین که ژن آن به صورت کلون شده

درصد) روی کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. کاغذ نیتروسلولز با استفاده از بافر PBST (بافر PBS با ۰/۰۵ درصد توتین-۲۰) حاوی ۵ درصد شیر خشک در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ شب پوشانده شد. غشا در بین هر مرحله، سه بار با بافر PBST شستشو داده شد. آنتی His-Tag، کونژوگه با HRP، با رقت ۱:۱۰۰۰۰ در داخل بافر PBST تهیه گردید و روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت و سپس شستشو انجام گرفت. ۱۵ میلی لیتر بافر ظهور (تریس ۵۰ میلی مولار حاوی ۱۰ میلی گرم دی آمینوبنزیدين و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه) روی کاغذ نیتروسلولز ریخته شد و پس از ظهور باند مورد نظر، واکنش توسط آب مقطر متوقف گردید.

تهیه نانوزل کیتوسان-TPP: به منظور تهیه نانوذرات کیتوسان فسفریله (PCS)، ۰/۰۵ گرم از کیتوسان در ۲۰ میلی لیتر اسیداستیک ۱ درصد در دمای اتاق با هم زدن حل گردید تا یک محلول یکنواخت و همگنی از کیتوسان با غلظت ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. محلول TPP با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در آب مقطر نیز تهیه شد و PH آن با اسید کلریدریک ۴ نرمال روی ۴ تنظیم گردید. محلول TPP به دست آمده بصورت قطره قطره به محلول کیتوسان فوق در حین سونیکاسیون مداوم با فرکانس ۷۰ کیلوهرتز و در حین هم زدن اضافه گردید و بدین ترتیب محلول نانوذره کیتوسان فسفریله با نسبت ۴:۱ از CS : TPP در مدت ۷۵ دقیقه به دست آمد. محلول حاصل به مدت ۲ ساعت دیگر هم زده شد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط ساترifiوژ گردید. رسوب حاصله دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده و پس از آن در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر به کمک سونیکاسیون معلق گردید و PCS به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی گراد و درون یخچال نگهداری شد.

بررسی شکل ظاهری و تعیین اندازه نانوذرات با میکروسکوپ

(ایزوپروپیل ۱-D-β تیوگالاتوپیرانوزید) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت القا شد.

استخراج پروتئین نوترکیب: برای استخراج پروتئین نوترکیب، ابتدا سلول های رسوب داده شده از ۵۰ میلی لیتر محیط کشت با ۵ میلی لیتر بافر لیزکننده B (NaH₂PO₄ ۱۰۰ میلی مولار، Tris-HCl ۱۰ میلی مولار، Urea ۸ مولار) مخلوط شده و از طریق سونیکاسیون با قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۵ در ۴ چرخه زمانی (هر کدام شامل ۲۰ ثانیه سونیکاسیون و ۵ دقیقه استراحت درون یخ) شکسته شدند. سپس نمونه ها با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه ساترifiوژ شده و از محلول رویی جهت بررسی بیان به وسیله SDS-PAGE استفاده شد. نمونه های پروتئینی، تحت شرایط داناتوره به همراه نشانگر وزن پروتئین روی ژل پلی اکریل آمید با غلظت ۹ درصد و شدت جریان ۱۷ میلی آمپر به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند.

تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل: ابتدا ستون کروماتوگرافی نیکل با بافر B(PH=۸) شستشو داده شد. بعد از خروج کامل بافر از ستون، محلول پروتئینی حاصل از مرحله قبل به ستون اضافه و خروجی آن در یک ظرف جمع آوری شد. سپس ۱/۵ میلی لیتر بافر شستشوی C (PH=۶/۳) به ستون اضافه و محلول خروجی آن نیز در یک ظرف جداگانه جمع آوری شد. پس از خروج کامل بافر شستشوی C، ۱/۵ میلی لیتر بافر شستشوی D (PH=۵/۹) به ستون اضافه و محلول خروجی آن در یک میکروتیوب دیگر جمع آوری شد. محلول های خروجی ستون پس از تیمار با سمپل بافر توسط SDS-PAGE بررسی شدند.

تایید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات: پس از تفکیک باندهای پروتئینی با SDS-PAGE، این باندها به کمک سیستم وسترن بلاتینگ (Biorad, USA) و بافر انتقال (گالاسین ۱۵۰ میلی مولار، تریس ۲۰ میلی مولار و متانول ۲۰

الکترونی: جهت آماده سازی نمونه برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (KYKY) مونتاز چین) چند قطره از نانوذله تهیه شده، روی فویل آلومینیومی پخش و با حرارت دادن ملایم خشک گردید. سپس نمونه‌ها بر روی یک نگهدارنده قرار داده شدند و تحت خلاء در آون خشک و با طلا پوشیده شدند تا سطح هادی الکتریکی باشد. ذرات در یک شتاب ولتاژ ۱۰ کیلو ولت و با یک بزرگنمایی ۱۰kx (۱۰ هزار برابر) مشاهده شدند.

بارگذاری نانوذرات و تعیین ظرفیت بارگذاری: ۰/۵ میلی لیتر از PCS (با غلظت کیتوسان ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل با ۱/۲۵ میلی گرم از پروتئین ایتیمین (محلول در PBS) به کمک سونیکاسیون با قدرت ۴۰ مخلوط گردیدند. مخلوط حاصل پس از یک روز که در دمای محیط در حال هم خوردن قرار گرفت، با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مقدار پروتئین موجود در محلول برداشته شده با روش برادفورد اندازه گیری شد.

بارگذاری مؤثر (LE) و ظرفیت بارگذاری (LC) دارو بر طبق معادلات زیر محاسبه گردید:

$$\text{مقدار پروتئین کل} / (\text{پروتئین آزاد} - \text{مقدار پروتئین کل}) = \text{LE}$$

$$\text{مقدار کیتوسان فسفریله} / (\text{پروتئین آزاد} - \text{مقدار پروتئین کل}) = \text{LC}$$

تعیین اندازه بار و قطر نانو ذرات PCS از طریق پراکنش دینامیکی نور (DLS): برای اندازه گیری قطر نانوذرات ابتدا ۱ سی سی از نمونه‌ی نانوذله در PBS رقیق شد تا به غلظت نهایی ۰/۱ درصد وزن خشک نانوذله در مخلوط رسید. مخلوط حاصل در حمام آب سونیکیتور آبی (با افزودن یخ) سونیکه شد تا نانوذرات کاملاً پراکنده شوند. سپس نمونه‌ی حاصل به نام S1 و نانوذله بارگذاری شده با پروتئین ایتیمین به نام S2، در کوت مخصوص دستگاه قرار گرفته و قطر و پراکندگی نانوذرات اندازه گیری شد. همچنین حرکت

الکتروفوریتیک ذرات نانوذله با استفاده از دستگاه Zeta sizer (MALVERN انگلستان) در فاز PALS محاسبه گردید. میانگین قطر ذرات با حداقل ۳۰ مرتبه تکرار به همراه شاخص پراکندگی (pdl) توسط دستگاه محاسبه شد.

ایمن سازی موش‌های آزمایشگاهی: در این مطالعه ۲۰ سر موش نر نژاد Balb/C با محدوده وزنی ۲۰ تا ۲۲ گرم از موسسه‌ی سرم و واکسن سازی رازی (کرج - ایران) تهیه گردید. حیوانات در شرایط استاندارد و با دسترسی آزادانه به آب و غذا به دو گروه ۱۰ تایی تقسیم و در دو قفس مجزا نگهداری شدند. یک گروه جهت آزمایش ایمنی زایی نانوذرات از مسیر خوراکی و گروه دیگر به عنوان آزمایش ایمنی زایی از مسیر تزریقی در نظر گرفته شدند. اصول اخلاقی در مورد کار با حیوانات رعایت گردید. در گروه اول به معده ۵ موش نانو ذرات PCS بارگذاری شده با پروتئین ایتیمین گاوآژ شد و یک گروه ۵ تایی موش به عنوان شاهد، PCS بدون پروتئین ایتیمین از طریق گاوآژ دریافت کردند. در گروه ۱۰ تایی دوم به ۵ سر از موش‌ها پروتئین ایتیمین به صورت زیر جلدی تزریق شد و به ۵ سر دیگر به عنوان شاهد، تنها PBS به همراه ادجوانت تزریق شد.

نانو ذرات PCS حاوی ۳۷۵ میکروگرم آنتی ژن ایتیمین با سانتریفیوژ ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد و رسوب با ۱/۵ میلی لیتر بافر PBS تازه مخلوط گردید. سپس سونیکاسیون در قدرت ۴۰ درصد و سیکل ۰/۵ انجام شد تا رسوب در PBS پراکنده شده و به صورت هموزن درآمد. مخلوط هموزن به ۵ حجم ۳۰۰ میکرولیتری (حاوی نانوذرات دارای ۷۵ میکروگرم پروتئین)، جهت خوراندن به ۵ سر موش تقسیم بندی شد.

جهت ایمن سازی موش‌های گروه تزریقی، به هر موش ۲۰ میکروگرم پروتئین ایتیمین به همراه ادجوانت فروند، به صورت زیر جلدی در ناحیه‌ی کمر تزریق شد. در هر دو گروه خوراکی و تزریقی، دوره‌های ایمن سازی به صورت

میکرولیتر ماده تترامیتیل بنزیدین (Banglor Genai India) اضافه شد و سپس پلیت به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۳ مولار به هر چاهک متوقف و جذب نوری چاهک‌ها توسط دستگاه خواننده الیزا (TECAN) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

چالش موش‌های تست و کنترل با باکتری *E.coli* O157:H7: به منظور کاهش فلور نرمال دستگاه گوارش، به همه‌ی موش‌ها به مدت یک شب به جای آب معمولی، آب حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین سولفات با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر داده شد. بعد از استرپتومایسین سولفات، موش‌ها به مدت ۱۵ تا ۱۸ ساعت بدون غذا نگهداری شدند. بعد از طی این مراحل به معده هر موش تعداد 10^{11} باکتری *E.coli* O157:H7 در ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS استریل گاوآژ شد. نمونه مدفوع موش‌های تست و کنترل هر روز و به مدت ۱۴ روز جمع‌آوری گردید. جهت اندازه‌گیری ریزش باکتری *E.coli* O157:H7 ابتدا ۰/۱ گرم مدفوع از هر دو گروه تست و کنترل توزین شد. ۱ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع، همراه مدفوع وزن شده به هر اپندورف اضافه شد و محیط کشت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا مدفوع نرم شده و باکتری‌ها رشد کنند. سپس اپندورف‌ها به شدت ورتکس شدند. پس از ته نشین شدن مواد نامحلول نمونه مدفوع، رقت‌های متوالی از مایع رویی تهیه و در محیط سوربیتول مک کانکی آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۵ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس کلنی‌های O157:H7 که در محیط سوربیتول مک کانکی آگار، به دلیل عدم تخمیر سوربیتول سفید رنگ هستند، مورد شمارش قرار گرفتند.

یافته‌ها

بیان پروتئین اینتیمین: پس از القای ژن کلون شده با

۴ مرحله با فواصل ۱۵ روزه بود. به منظور تهیه سرم، از موش‌های تست و کنترل خونگیری به عمل آمد. نمونه‌های خون با چرخش ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی شفاف زرد رنگ (سرم) به دست آمده جهت استفاده در مراحل بعدی و تعیین آنتی بادی جدا گردید و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. تعیین تولید آنتی بادی به روش الیزای غیر مستقیم: در این روش، از سرم جهت بررسی تیتراژ آنتی بادی IgG برای انجام الیزا استفاده شد. مقدار ۵ میکروگرم از پروتئین تخلیص شده همراه با ۱۰۰ میکرولیتر بافر تثبیت کننده در داخل چاهک‌های پلیت الیزا (شرکت کاسپین) ریخته شد. به منظور کنترل اجزای واکنش الیزا، در ستون مورد نظر دو چاهک جهت کنترل در نظر گرفته شد که به یکی از این چاهک‌ها آنتی ژن اضافه شد و دیگری به عنوان کنترل منفی خالی ماند. سپس میکروپلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از تخلیه‌ی مواد مرحله‌ی اول، چاهک‌ها ۴ مرتبه با ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBST (بافر PBS + توئین ۰/۰۵ درصد) شستشو داده شد و هر بار ۵ مرتبه درون چاهک پر و خالی گشت. سپس با ضربه زدن بر روی نظیف پارچه‌ای، خشک گردید. جهت جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته سرم و کانژوگه با میکروپلیت، داخل تمام چاهک‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ (PBST + ۵ درصد پودر شیر خشک) ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از شستشوی چاهک‌ها، رقت‌های ۱/۲۵۰ تا ۱/۳۲۰۰۰ از نمونه سرم تهیه شد و از هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های مورد نظر اضافه شد. پلیت به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی بادی کانژوگه ضد IgG موشی با رقت ۱/۱۰۰۰ به چاهک‌های مربوطه اضافه و سپس پلیت الیزا در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. پس از شستشو، به هر چاهک ۱۰۰

IPTG، جداسازی پروتئین‌ها به روش دناتوره انجام شد و نتیجه بر روی SDS-PAGE ۹ درصد مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین ایتیمین بدون فیوژن، ۵۵ کیلودالتون است و با فیوژن وکتور pET32a مجموعاً ۷۵ کیلودالتون می‌شود که در شکل ۱ نشان داده شده است.

تخلیص پروتئین ایتیمین با ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل: جهت تخلیص پروتئین ایتیمین از بافرهای شستشو دهنده‌ی C و D حاوی اوره ۸ مولار به ترتیب با PH های ۶/۳ و ۵/۹ استفاده شد. پس از بارگذاری نمونه بر روی ستون و شستشوی ستون با بافر C، ستون با بافر D شستشو داده شد و خروجی حاصل از شستشو با بافر D جمع آوری و با SDS-PAGE آنالیز شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. **تایید پروتئین بیان شده، با روش Western blot:** برای اطمینان از صحت پروتئین نوترکیب تولید شده، از روش وسترن بلات استفاده شد. پروتئین خالص شده، الکتروفورز گردید و سپس به کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. با انجام وسترن بلات مشخص شد که آنتی HisTag به‌طور اختصاصی با HisTag فیوز شده به پروتئین‌های نوترکیب واکنش می‌دهد که نتیجه‌ی آن در شکل ۱ آمده است.

برآورد اندازه و شکل نانوذرات PCS با SEM: در مشاهده با میکروسکوپ الکترونی روبشی، محدوده اندازه‌ی ذرات از ۱۷۷/۵ تا ۴۴۴/۵ نانومتر (متوسط اندازه ذرات، ۳۰۶/۸۵ نانومتر) بود که در شکل ۲ نشان داده شده است.

برآورد اندازه ذرات و پتانسیل زتا به وسیله DLS و Zeta sizer: اندازه‌ی ذرات و پتانسیل زتا حاصل، برای هر دو نمونه نانوذرات PCS بدون پروتئین و بارگذاری شده با پروتئین، در آب مقطر و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین شد. پتانسیل زتای نمونه پس از بارگذاری پروتئین نوترکیب از ۵/۴۸- دچار تغییر شده و به ۶/۳۶- رسید. همچنین اندازه‌ی نانوذرات نیز از ۱۵۲/۲ به ۲۱۸ افزایش یافت. شاخص پراکندگی نانوذرات تهیه شده ۰/۰۸۲ بود.

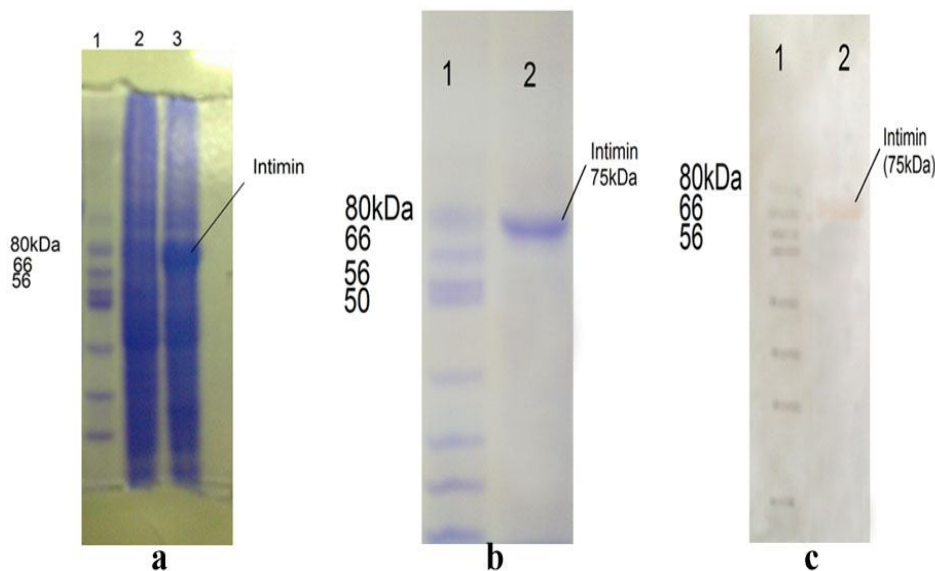
ظرفیت بارگذاری پروتئین ایتیمین در نانوذرات PCS: ظرفیت‌های موثر و بارگذاری در ۲۴ ساعت نخست، ۵۲ درصد بود که پس از گذشت ۴۸ ساعت به ۱۰۰ درصد رسید. ارزیابی ایمنی، به کمک روش ELISA: به منظور تایید تولید آنتی‌بادی و ایجاد پاسخ ایمنی، بعد از تزریق سوم و همچنین ۷ روز پس از چهارمین تزریق از موش‌های تست و کنترل، خون‌گیری به عمل آمد. سرم‌های جدا شده به صورت جداگانه برای قابلیت شناسایی و اتصال به پروتئین نوترکیب ایتیمین توسط روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. برای مشخص شدن میزان حضور آنتی‌بادی IgG در سرم، رقت‌های متعددی از آن تهیه شده و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الایزا در شکل ۳ نشان داده شده است. در این شکل افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در گروه تست که آنتی‌ژن را به صورت تزریقی دریافت کرده بودند دیده می‌شود. نتایج به دست آمده از تیتراژ آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در موش‌های ایمن شده تیتراژ آنتی‌بادی IgG به صورت بارزی بالاتر از گروه کنترل ($P < 0.01$) بود. در هر مرحله از تزریق شاهد افزایش تیتراژ آنتی‌بادی بودیم به نحوی که بیشترین میزان OD مربوط به رقت ۱/۲۵۰ در تزریق چهارم و به میزان ۲/۲ بود.

شکل ۴ بیانگر این است که تجویز خوراکی نانوذرات حاوی آنتی‌ژن نیز همانند گروهی که به صورت تزریقی، تجویز شده بودند، منجر به افزایش تیتراژ آنتی‌بادی IgG در هر مرحله شده است. نتایج به دست آمده تیتراژ آنتی‌بادی نشان می‌دهد که در موش‌های ایمن شده با نانوذرات حاوی آنتی‌ژن تیتراژ آنتی‌بادی IgG به صورت بارزی بالاتر از گروه کنترل ($P < 0.01$) بود.

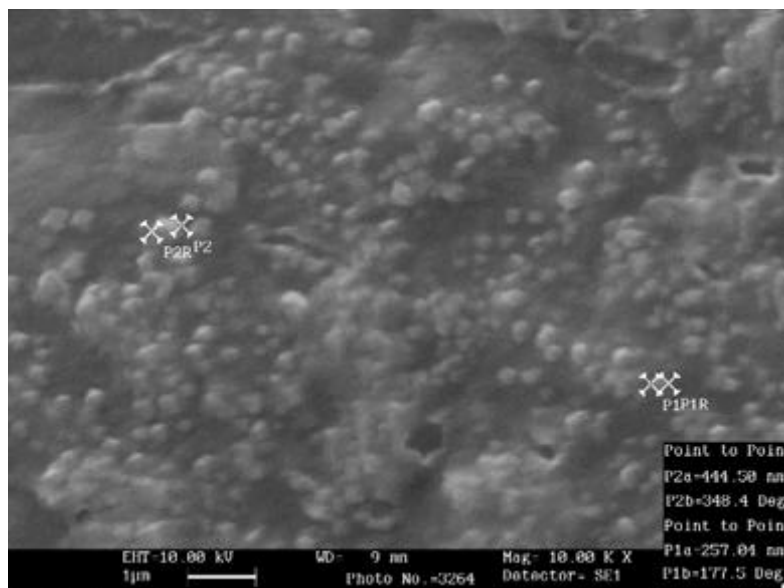
چالش موش‌های ایمن و غیر ایمن در برابر دوز خوراکی باکتری E.coli O157:H7: ریزش باکتری از مدفوع موش‌ها در یک دوره ۱۴ روزه متوالی و با شمارش کلنی اندازه‌گیری شد که نتایج در شکل ۵ آمده است. کاهش ریزش باکتری از مدفوع موش‌های ایمن شده از طریق خوراکی نسبت به موش‌های ایمن شده از طریق تزریقی و موش‌های غیر ایمن

طریق مدفوع دفع می‌نمایند. اما در موش‌های ایمن شده پس از روز ششم، این تعداد به مقدار زیادی کاهش می‌یابد.

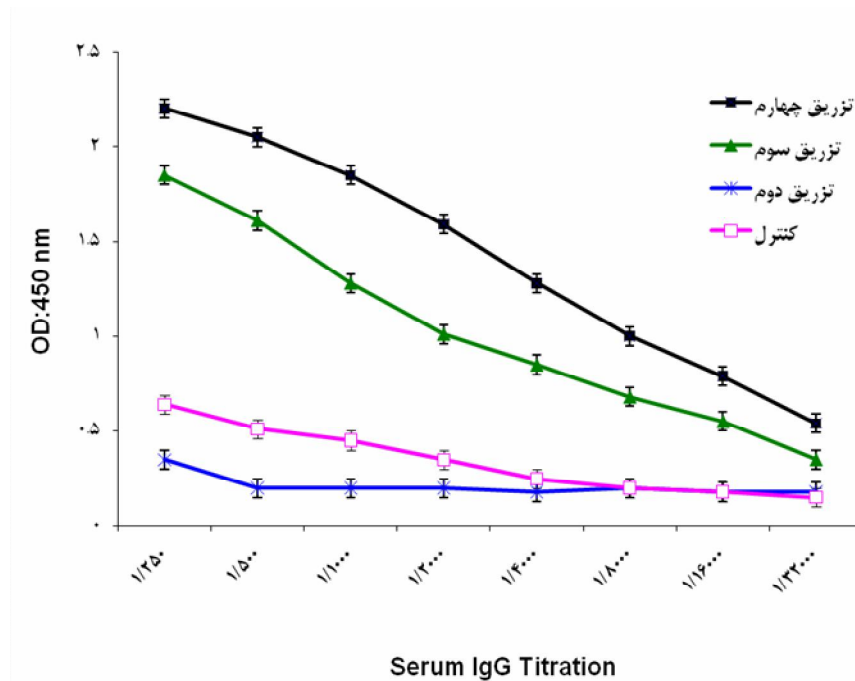
مشهود است. در موش‌های ایمن نشده، تعداد باکتری‌ها تا روز اول افزایش می‌یابد و پس از یک کاهش نسبی تا روز هشتم به تعادل رسیده و همواره تعداد مشخصی از باکتری را از



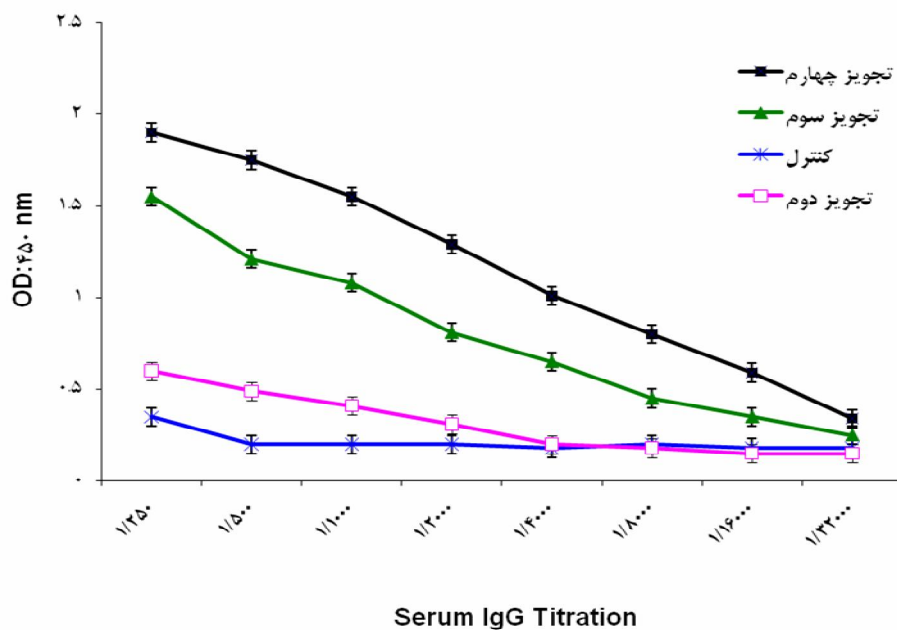
شکل ۱: بیان پروتئین اینتیمین (a). ردیف ۱: نشانگر وزن پروتئین، ردیف ۲: کلون القا نشده، ردیف ۳: کلون القا شده
تخلیص پروتئین اینتیمین (b). ردیف ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ردیف ۲: خروجی حاصل از شستشوی ستون با بافر D
وسترن بلاتینگ (c). ردیف ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ردیف ۲: واکنش پروتئین اینتیمین با آنتی بادی ضد هیستیدین



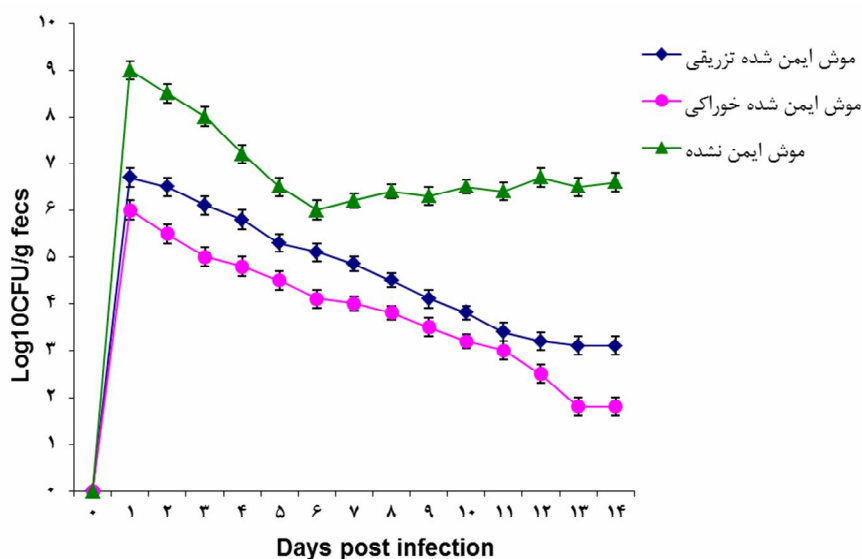
شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از نانوذرات PCS



شکل ۳: تیتر آنتی بادی IgG تولید شده در موش پس از تزریق ایتیمین. می‌توان گفت که مقدار آنتی بادی‌های تولید شده بر علیه پروتئین ایتیمین در سرم موش در تزریق چهارم همواره بیشتر از تزریق سوم بوده است.



شکل ۴: تیتر آنتی بادی IgG پس از تجویز خوراکی نانوذرات حاوی آنتی ژن ایتیمین. محور افقی، رقت‌های تهیه شده از سرم موش‌های مورد مطالعه، محور عمودی، میزان OD که از رقت‌های مختلف سرم به دست آمده است.



شکل ۵: نمودار ریزش باکتری *E.coli* O157:H7 در مدفوع موش‌های ایمن شده با پروتئین اینتیمین به صورت تزریقی و موش‌های ایمن شده با PCS بارگذاری شده با پروتئین اینتیمین به صورت خوراکی، کاهش ریزش باکتری از مدفوع موش‌های ایمن شده از طریق خوراکی نسبت به موش‌های ایمن شده از طریق تزریقی مشهود است.

بحث

فیبریا خود را به سطح سلول‌های میزبان نزدیک کرده و به آن متصل می‌گردد. باکتری *E.coli* O157:H7 از طریق پروتئین اینتیمین می‌تواند به دیواره‌ی روده اتصال یابد. مطالعات بیشتر بر روی پروتئین داخل غشایی اینتیمین نشان داده است که تحریک سیستم ایمنی بر علیه این جزء می‌تواند در اتصال و متعاقب آن بیماری‌زایی باکتری ایجاد اختلال جدی نماید (۳۰). آزمایشات انجام شده توسط کاروالهو نشان داد که نقش اصلی در ایمنی‌زایی مربوط به انتهای کربوکسیل اینتیمین است (۳۱). به عبارت دیگر اپی توپ‌های مستقر در انتهای کربوکسیل نقش اصلی در ایجاد ایمنی را به عهده دارند. با توجه به عملکرد باکتری و منشأ شروع بیماری که روده می باشد، در این تحقیق استفاده از نانوذرات به عنوان حامل برای انتقال خوراکی پروتئین نو ترکیب به روده مد نظر قرار گرفت. مزیت استفاده از نانوذرات به عنوان حامل انتقال دارو به دو ویژگی اختصاصی این مواد برمی‌گردد. اول اینکه نانوذرات به

اشریشیاکلی انتروهموراژیک از جمله زیر گروه‌های اشریشیا کلی تولید کننده‌ی شیکا توکسین می‌باشند که باعث ایجاد کولیت هموراژیک و سندرم همولیتیک اورمیک در انسان می‌شوند. مهم‌ترین سروتایپ شایع، O157:H7 می‌باشد که تاکنون باعث اپیدمی و مرگ و میر در کشورهای آمریکای شمالی، اروپا و کانادا شده است. دام‌ها از مهم‌ترین منابع عامل بیماری می‌باشند و آب و مواد غذایی و سبزیجات از مهم‌ترین راه‌های انتقال بیماری به شمار می‌روند. سویه‌های O157:H7 با دوز عفونی بسیار کم می‌تواند بیماری را ایجاد نمایند. همه گیری‌های ایجاد شده توسط این ارگانیسم معمولاً با مصرف آب و غذای آلوده با مدفوع گاو و همچنین شیر غیر پاستوریزه و آبمیوه و سبزیجات تازه همراه بوده است. این باکتری در دو مرحله به ایجاد ضایعات و ایجاد بیماری می‌پردازد. در مرحله‌ی اول با استفاده از اجزای سلولی نظیر

دلیل اندازه‌ی کوچکشان می‌توانند از طریق مویرگ‌های کوچک به سلول‌های مورد نظر نفوذ کرده و در نتیجه باعث تجمع کارآمد دارو در جایگاه‌های هدف در بدن شوند. دوم اینکه استفاده از مواد زیست تخریب پذیر در تهیه‌ی نانو ذره باعث انتشار پایدار و یکنواخت دارو در جایگاه هدف برای یک دوره چند روزه یا چند هفته‌ای می‌شود (۳۳ و ۳۲). کیتوسان به عنوان پلیمری غیرسمی با تجزیه پذیری زیستی، سازگاری زیستی و ایمنی‌زایی بسیار کم، نانوذره بسیار مناسبی برای دارو رسانی است. کیتوسان با اتصال دهنده متقاطع‌تری پلی فسفات (TPP) تهیه شد. یکی از روش‌های مناسب و موثر برای اصلاح خواص هیدروژل کیتوسان، ایجاد چگونگی ایجاد اتصالات عرضی در آن است. گروه‌های آمین و هیدروکسیل موجود در واحدهای گلوکز آمین کیتوسان مناطق واکنش دهنده‌ی مناسبی برای ایجاد اتصالات عرضی می‌باشند. روش جدید ارائه شده در این تحقیق برای تهیه‌ی نانوذرات بر پایه کیتوسان، روش ساده یک مرحله‌ای تهیه‌ی نانوذله PCS با نسبت ۱ : ۴ برای کیتوسان: TPP بود. با تغییر نسبت مولی کیتوسان، TPP امکان عملکرد نانوذرات حاصل در pH فیزیولوژیک مهیا گردید. ضمناً نانوذله PCS حاصل به‌سادگی با انکوباسیون با پروتئین بارگذاری گردید و کاربرد آن در پروتئین رسانی کنترل شده در pH فیزیولوژیک بیشتر شد. ترانه جو و ایبزم گزارش دادند که غلظت TPP در تهیه PCS می‌تواند در تجمع و اندازه ذرات نقش حیاتی داشته باشد (۳۳ و ۲۸). در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین، متعاقب اثر TPP بر کیتوسان، بارهای مثبت موجود در کیتوسان به بار منفی تغییر یافته و در نتیجه در ترکیب حاصل میل ایجاد اتصال الکترواستاتیک با سطح موکوس بالاتر رفته و بدین ترتیب یک نانوذله مناسب برای دارو رسانی هدفمند خصوصاً به روش غیرفعال ایجاد گردید. در حالی که در تهیه‌ی نانوذله‌های دیگری مانند PLGA، تهیه نانوذله و بارگذاری آن طی مراحل متعدد و در حین تهیه نانوذله صورت

می‌گیرد (۳۳). پلیمر کیتوسان در pH فیزیولوژیک نامحلول بوده و استفاده از TPP برای ایجاد اتصالات عرضی باعث افزایش حلالیت نانوذله PCS حاصل در pH فیزیولوژیک (۷/۴) شد. استفاده از غلظت‌های بیشتر TPP باعث پل زدن TPP بین ذرات کیتوسان و در نتیجه بزرگ شدن ذرات، تجمع و رسوب آن‌ها شد و پلیمر را غیر محلول ساخت. طبق تحقیقات تی‌سای و همکارانش، افزایش غلظت کیتوسان می‌تواند باعث افزایش متوسط قطر نانوذرات شود. بر این اساس در این تحقیق نیز حداکثر غلظت کیتوسان مورد استفاده ۱/۵ میلی‌گرم در نظر گرفته شد (۳۴).

در تحقیق حاضر میانگین اندازه‌ی ذرات برای نانوذله PCS حدود ۱۵۲ نانومتر با PDI حدود ۰/۴ و پتانسیل زتای ۵/۴۸- میلی ولت به‌دست آمد. در شرایط کپسوله شده برای پروتئین ایتیمین میانگین اندازه ۲۱۸ نانومتر با PDI ۰/۰۸ و پتانسیل زتای حدود ۶- میلی ولت به‌دست آمد. استفاده از روش تغییر یافته این تحقیق سبب کاهش اندازه نانوذرات تهیه شده گردید. در تحقیق دوای و همکاران سایز نانوذرات کیتوسانی تهیه شده بین ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر بوده که در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر بزرگتر می‌باشند (۳۵).

همان گونه که در نتایج به‌دست آمده از میزان بارگذاری نانوذله PCS، مشاهده گردید ظرفیت بارگذاری (LC) با افزایش غلظت پروتئین و رسیدن به نسبت ۱ : ۱ و افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافت. در تحقیقات اتابی و همکارانش با ۲۴ ساعت انکوباسیون نانوذله PCS با داروی دکسورویسین، مقدار بارگذاری موثر (LC) ۹۷ درصد به دست آمد. آن‌ها همچنین افزایش زمان انکوباسیون را تنها عامل تاثیر گذار بر LE، شناسایی کردند و این گونه گزارش نمودند که با رعایت نسبت ۱ : ۱ از PCS: DOX می‌توان از ظرفیت کامل بارگذاری نانوذله بهره برد (۳۶). در صورتی که طبق گزارشات ترانه جو و همکارانش، عوامل دیگری مثل غلظت کیتوسان و مقدار TPP، نسبت پروتئین به پلیمر و

موش‌ها حاکی از این بود که ریزش باکتری در مدفوع موش‌های ایمن کاهش قابل توجهی دارد. در موش‌های ایمن شده با پروتئین ایتیمین از مسیر تزریقی از روز دوازدهم به بعد ریزش باکتری تقریباً ثابت ماند. در موش‌هایی که نانوذرات PCS بارگذاری شده با پروتئین ایتیمین به صورت خوراکی دریافت کرده بودند، در روز هشتم حدوداً کمتر از 10^3 باکتری *E.coli* O157:H7 شمارش شد. در حالی که نمودار ریزش باکتری O157:H7 در مدفوع موش‌های غیر ایمن یک شیب ملایم داشت و تعداد باکتری شمارش شده در روز چهاردهم، حدوداً 10^8 بود. یکی از نتایجی که در این تحقیق به آن توجه گردید این بود که در روش ایمن سازی تزریقی حیوان آزمایشگاهی اگر تیتراژ آنتی بادی به دست آمده در مقایسه با ایمنی‌زایی خوراکی با استفاده از نانوذرات کیتوسان بالاتر بود اما میزان حفاظت بخشی به‌طور معکوسی حاصل شد. به نحوی که میزان دفع باکتری در موش‌های ایمن شده به روش تزریقی بیشتر از موش‌های ایمن شده به روش خوراکی بود. این نتیجه موید آن است که روش ایمنی سازی حیوان باید متناسب با مکانیسم ایجاد بیماری و موضع شروع عفونت در بدن باشد.

نتیجه گیری

حفاظت بخشی موش‌های ایمن شده با نانوذرات حاوی ایتیمین از مسیر خوراکی بهتر از ایتیمین محلول از مسیر تزریقی بود.

سرعت بهم زدن، ممکن است بارگذاری موثر (LE) دارو یا عوامل بیولوژیکی دیگر را تحت تاثیر قرار دهد (۲۸). شهسواری و همکاران نیز گزارش نمودند که کاهش غلظت در نسبت کیتوسان به TPP می‌تواند بر روی LE اثر داشته باشد (۳۷).

ظرفیت بالای بارگذاری (LC) نانوذلهای کیتوسان با پروتئین در خارج از بدن و در آزمایشگاه، می‌تواند آن‌ها را به‌عنوان کاندید مناسبی برای انتقال پروتئین و واکسن رسانی مطرح نماید. در این تحقیق ظرفیت بارگذاری نانوذلهای کیتوسان پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با پروتئین حدود ۵۲ درصد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به ۱۰۰ درصد رسید که در مقایسه با سایر پژوهش‌هایی که در بالا اشاره شد (۳۷ و ۲۸) بیشتر می‌باشد. در این راستا، نانوتکنولوژی و توسعه واکسن‌های مبتنی بر نانو حامل‌ها به دلیل ایجاد ایمنی موثرتر از طریق هدف گیری بهتر سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن و نیز تحریک پاسخ‌های ایمنی در سطح سلولی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به علاوه توجه محققین بر روی راه‌های تجویز واکسن به منظور القای هر دو ایمنی سیستمیک و مخاطی علیه پاتوژن نیز متمرکز شده است. بنابراین از طریق انتخاب آگاهانه سیستم‌های مبتنی بر فناوری نانو و نوع آنتی ژن و نیز مسیر تجویز واکسن، ایمن سازی و حفاظت مطلوب و بهینه علیه بیماری می‌تواند القا شود (۳۸).

جهت چالش موش‌های ایمن شده با آنتی ژن ایتیمین از باکتری *E.coli* O157:H7 استفاده شد. نتیجه‌ی چالش

References

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

2- Nazarian S, Gargari S, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Res*. 2014; 169: 205-12.

3- Farfan M, Torres A. Molecular mechanisms

- that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*. 2012; 80: 903-13.
- 4- Mousavi S, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, toxigenic *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhimurium* by multiplex PCR. *Iranian J Clin Infect Dis*. 2009; 4: 97-103.
- 5- Larrie-Bagha S, Rasooli I, Mousavi-Gargari S, Rasooli Z, Nazarian S. Passive immunization by recombinant ferric enterobactin protein (FepA) from *Escherichia coli* O157. *Iran J Microbiol*. 2013; 5: 113-9.
- 6- Amani J, Ahmadpour A, Imani Fooladi A, Nazarian S. Detection of *E. coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR-ELISA. *Braz J Infect Dis*. 2015; 19: 278-84.
- 7- Blanco M, Blanco J, Mora A, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae). *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 645-51.
- 8- Karmali M, Gannon V, Sargeant J. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*. 2010; 140: 360-70.
- 9- Shekarforoush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. Detection and frequency of Stx2 gene in *Escherichia coli* O157 and O157: H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. *Pak J Biol Sci*. 2008; 11: 1085-92.
- 10- Sheng H, Lim J, Knecht H, Li J, Hovde C. Role of *Escherichia coli* O157: H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infect Immun*. 2006; 74: 4685-93.
- 11- Ferens W, Hovde C. *Escherichia coli* O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8: 465-87.
- 12- Besser T, Richards B, Rice D, Hancock D. *Escherichia coli* O157 [ratio] H7 infection of calves: infectious dose and direct contact transmission. *Epidemiol Infect*. 2001; 127: 555-60.
- 13- Schmidt M. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol*. 2010; 12: 1544-52.
- 14- Yang J, Tauschek M, Hart E, Hartland E, Robins-Browne R. Virulence regulation in *Citrobacter rodentium*: the art of timing. *Microbial biotech*. 2010; 3: 259-68.
- 15- Tree J, Wolfson E, Wang D, Roe A, Gally D. Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*. 2009; 17: 361-70.
- 16- Tobe T, Beatson S, Taniguchi H et al. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 14941-46.
- 17- Thomas N, Deng W, Baker N, Puente J, Finlay B. Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2007; 282: 29634-45.
- 18- Campellone K. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and

- enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *FEBSJ*. 2010; 277: 2390-2402.
- 19- Misyurina O, Asper D, Deng W, Finlay B, Rogan D, Potter A. The role of Tir, EspA, and NleB in the colonization of cattle by Shiga toxin producing *Escherichia coli* O26: H11. *Can J Microbiol*. 2010; 56: 739-47.
- 20- Takahashi I, Nochi T, Yuki Y, Kiyono H. New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21: 352-58.
- 21- Van der Lubben I, Verhoef J, Borchard G, Junginger H. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliver Rev*. 2001; 52: 139-44.
- 22- He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010; 31: 3657-66.
- 23- OHagan D, Singh M, Ulmer J. Microparticle-based technologies for vaccines. *Methods*. 2006; 40: 10-19.
- 24- Badawy M, Rabea E. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int J Carbohydr Chem*. 2011; 2011: 1-29.
- 25- Prego C, Garcia M, Torres D, Alonso M. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Control Release*. 2005; 101: 151-162.
- 26- Kang M, Cho C, Yoo H. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol Adv*. 2009; 27: 857-65.
- 27- Koppolu B, Zaharoff D. The effect of antigen encapsulation in chitosan particles on uptake, activation and presentation by antigen presenting cells. *Biomaterials*. 2013; 34: 2359-69.
- 28- Taranejoo S, Janmaleki M, Rafienia M, Kamali M, Mansouri M. Chitosan microparticles loaded with exotoxin A subunit antigen for intranasal vaccination against *Pseudomonas aeruginosa*: An in vitro study. *Carbohydr Polym*. 2011; 83: 1854-61.
- 29- Hu Y, Jiang X, Ding Y, Ge H, Yuan Y, Yang C. Synthesis and characterization of chitosanpoly (acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*. 2002; 23: 3193-3201.
- 30- Gansheroff L, Wachtel M, O'Brien A. Decreased adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-Terminal region of intimin. *Infect Immun*. 1999; 67: 6409-17.
- 31- Carvalho H, Teel L, Kokai-kun J, O'Brien A. Antibody against the carboxyl terminus of intimin α reduces enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to tissue culture cells and subsequent induction of actin polymerization. *Infect Immun*. 2005; 73: 2541-6.
- 32- Praetorius N, Mandal T. Engineered nanoparticles in cancer therapy. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2007; 1: 37-51.
- 33- Ibezim E, Andrade C, Marcia C, Barretto B, Odimegwu D, de Lima F. Ionically cross-linked Chitosan/Tripolyphosphate microparticles for the controlled delivery of pyrimethamine. *Ibnosina J Med Biomed Sci*. 2011; 3: 77-88.
- 34- Tsai M, Bai S, Chen R. Cavitation effects

versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosansodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohydr Polym.* 2008; 71: 448-57.

35- Doavi T, Mousavi SL, Kamali M, Amani J, Ramandi M. Chitosan-based intranasal vaccine against *Escherichia coli* O157: H7. *Iran Biomed J.* 2016; 20: 97-108.

36- Atabi F, Mousavi SL, Hashemi M, Yaghmaei P. Preparation and characterization of tripolyphosphate-chitosan nanogel as a doxorubicin carrier. *Int J Pharm.* 2014; 274: 1-33.

37- Shahsavari S, Vasheghani-Farahani E, Ardjmand M, Abedin Dorkoosh F. Modeling of drug released from acyclovir nanoparticles based on artificial neural networks. *Lett Drug Des Discov.* 2014; 11: 174-183.

38- Shahiwala A, Vyas T, Amiji M. Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery. *Recent Pat Drug Deliv.* 2007; 1: 1-9.

Chitosan Nanogel Based Candidate Vaccine against EHEC

Azimbeyk M¹, Mousavi Gargari SL¹, Nazarian SH²

¹Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

²Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Mousavi Gargari SL, Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

Received: 29 May 2016 **Accepted:** 22 Aug 2016

Background and Objective: *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) can cause diarrhea and hemorrhagic colitis in humans. The attachment of EHEC to intestinal epithelial cells is the first step of infection which the protein Intimin plays a key role in this process. An immunogen consisting of Intimin can inhibit the attachment of EHEC and prevent diarrhea. Encapsulation of antigens in particular carriers such as chitosan nanogels not only protects them from degradation in environmental conditions but also provides the effective concentrations of antigens in targets and increases bioactivity. The aim of this study was the investigation of immunization against EHEC using chitosan nanogels loaded with protein.

Materials and Methods: The protein was expressed in *E.coli* and purified. Chitosan nanogels were prepared by reacting chitosan with tripolyphosphate (TPP) as a crosslinking agent. The nanogels were loaded with Intimin and their structures were characterized by SEM and DLS. Nanogels and solution protein were introduced in Balb/C mice by oral and parenteral routes respectively. Antibody titers were determined by ELISA. Immunized and nonimmunized mice were tested with *E.coli* O157:H7.

Results: Loading efficiency of the nanogels was 100% after 48h of incubation. The average particle size was 218 nm. Immunization of mice induced serum IgG antibody response. The protection of immunized animals via oral route was better than parenteral route.

Conclusion: Chitosan nanogels loaded with Intimin can be used as an effective vaccine against EHEC.

Keywords: Chitosan nanogel, , *E.coli* O157:H7, Intimin, Immunogen