

## ایمنی زائی آنتی ژنهای نو ترکیب سیستم ترشحی نوع ۳ و زیر واحد اتصال سم شبه شیگا از باکتری *E.coli* O157 H7

مجتبی طاهری (BSc)<sup>۱</sup>، شهرام نظریان (PhD)<sup>۲\*</sup>، فیروز ابراهیمی (PhD)<sup>۳</sup>، مصطفی بخش (PhD)<sup>۴</sup>، جواد فتحی (BSc)<sup>۵</sup>

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/شرشیاکی (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 نو ترکیب EspA، Intimin و Stx2b در برابر عفونت باکتری *E.coli* O157 H7 می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تحقیقی، بیان پروتئین های نو ترکیب EspA، Intimin و Stx2b در *E.coli* BL21 DE3 با IPTG القا شد. پروتئین های نو ترکیب با وسترن بلات ارزیابی و کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA تخلیص گردید. ایمنی زایی زیر پوستی و درون صفاقی موش ها انجام و تیتر آنتی بادی توسط ELISA تعیین شد. موشها باخوردن باکتری آلوده و ریزش باکتری و مرگ و میر موش ها بررسی گردیدند.

**یافته ها:** آنالیز SDS-PAGE بیان پروتئین ها با وزن ۱۱،۰۷ و ۳۵ کیلودالتون را نشان داد. پروتئین های نو ترکیب توسط وسترن بلات تایید شد. تیتر پایانی الیزا برای پاسخ همورال 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 و Stx2b باعث حفاظت حیوان در چالش با *E.coli* O157: H7 می شود.

**واژه های کلیدی:** انتروهموراژیک/شرشیاکی، توکسین شبه شیگا، سیستم ترشحی نوع ۳، پروتئین نو ترکیب، ایمنی زایی.

### مقدمه

سویه های بیماری زای باکتری *E.coli* پاتوژن های خطرناکی هستند که ابتلا به آنها آسیب های متعددی را برای بیمار ایجاد می کند (۱ و ۲). 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 (۳ و ۴). 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 عفونت EHEC O157: H7، واکسن ها روشی امید بخش برای پیشگیری از عفونت را ارائه می کنند. سه شاخصه بیماری زایی اصلی EHEC شامل اتصال به سلول های اپیتلیال روده، حمله به سلول های 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 (۶ و ۷). لانه گزینی این باکتری در لوله گوارش به واسطه عوامل و فاکتور هایی است که تحت کنترل جزایر

پاتوژنیسته 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 زیر واحد مونومری آنزیمی StxA و زیر واحد پنج تایی متصل شونده به رستپور StxB تشکیل شده است (۸). چسبندگی اولیه باکتری به سلول های اپی تلیال توسط پیلی تشکیل دهنده دسته (Bundle forming pilus) انجام می شود 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 می گردد (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: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴

E-mail: nazarian56@gmail.com

عصاره سلولی پس از بیان سه پروتئین با استفاده از سیستم لکه گذاری و سترن 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 هیستیدین مجاور شد. برای آشکارسازی از سوبسترای DAB (-3' Diaminobenzidine) استفاده و واکنش با آب مقطر متوقف گردید (۷).

**ایمنی زایی و بررسی تیتراژ آنتی بادی:** جهت بررسی ایمنی زایی از موش های سوری ماده با وزن تقریباً 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 تیتراژ آنتی بادی از روش الیزا استفاده گردید. برای هر چاهک ۵ میکروگرم از پروتئین های نو ترکیب در بافر کوئینگ در نظر گرفته شد. مسدود کردن چاهک ها با PBST حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی انجام و در ادامه از رقت های 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 تیتراژ آنتی بادی حاصل از تجویز پروتئین ها در سطح تجویز دوم، سوم و چهارم مقایسه شد. همچنین اثر روش تجویز زیر پوستی و درون صفاقی بر تیتراژ آنتی بادی نیز بررسی گردید.

**بررسی ریزش باکتری در موش های 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 آزمون ها به آب موش ها آنتی بیوتیک استرپتومایسین سولفات (۵ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه و ۱۲ ساعت قبل از شروع آزمون آب و غذای حیوانات موقتاً حذف گردید. در ادامه به هر موش تعداد  $10^{10}$  باکتری E. coli O157:H7 خوراندند. نمونه مدفوع موش های 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 میلی لیتر محیط کشت مایع LB اضافه و تیوب ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. رقت های 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 سانتی گراد گرماگذاری شدند در نهایت اقدام به شمارش کلنی های سفید رنگ باکتری E. coli O157:H7 شد (۱۹).

**بررسی زنده ماندن موش های ایمن شده:** ۱۴ روز 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 موش ها 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

اتصال EHEC به سلول های میزبان می باشد (۹). Baranvand و همکاران با بررسی ایمنی زایی پروتئین نو ترکیب StxB شیگلا دیسنتری 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 زیر واحد B سم شبه شیگا نوع ۲ (Stx2B) و ایجاد ایمنی در حیوان آزمایشگاهی مشاهده کردند که سرم موش های ایمن، قادر به خنثی سازی سم می باشد و در آزمون چالش، حدود ۷۰ درصد موش های ایمن شده زنده ماندند (۱۳). Martorelli و همکاران مخلوط شامل پروتئین های نو ترکیب Intimin، EspB و Stx2B را به عنوان کاندیدی جهت واکسن علیه اشریشیاکلی O157:H7 به کار بردند. ترکیب پروتئینی توانست سیستم ایمنی همورال را به خوبی 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 نو ترکیب زیر واحد های اتصالی و توکسین (EspA، Stx2b، 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 نو ترکیب استفاده شد. جهت انتخابی نمودن رشد باکتری واجد پلاسمید نو ترکیب نیز از آنتی بیوتیک کانامایسین شرکت فرمنتاز استفاده شد. مواد شیمیایی، کیت و نشانگرهای مولکولی از شرکت های مرک، سیناژن، کیاژن و فرمنتاز تهیه شد. آنتی بادی ضد هیستیدین از شرکت abcam خریداری شد. برای تخلیص پروتئین نو ترکیب از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی نیکل- نیترویلو استیک اسید (Ni-NTA) شرکت کیاژن استفاده شد.

**بیان پروتئین های نو ترکیب Intimin، EspA، Stx2b:** پلاسمید های نو ترکیب حاوی ژن های 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 نو ترکیب 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 سانتی گراد و زمان ۵ ساعت القا گردید. عصاره سلول های بیانی بر روی ژل SDS-PAGE ۱۴ درصد مورد بررسی قرار گرفت (۱۷ و ۱۶).

**تخلیص و تایید پروتئین های نو ترکیب:** برای تخلیص پروتئین ها از روش دناتوره استفاده شد. محلول رویی حاصل از شکست سلول ها از رزین کروماتوگرافی گذرانده شد. در هر مرحله خروجی ستون جداگانه جمع آوری و نگهداری گردید. در مراحل بعدی به ترتیب بافرهای شستشوی C (Tris-HCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)؛ 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 پروتئین ها از ژل SDS-PAGE ۱۴ درصد استفاده شد. برای تایید پروتئین های نو ترکیب بیان شده از تکنیک ایمونوبلات با آنتی بادی ضد His-tag استفاده شد.

**چالش موشهای ایمن:** پس از چالش حیوان ها با باکتری *E.coli* O157:H7 موشهای غیرایمن، آلودگی را به صورت تقریباً 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  $10^8$  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  $10^2$  cfu/ml کاهش داشت (نمودار ۲). موش‌های ایمن شده به روش صفاقی میزان دفع باکتری آنها در پایان روز ۱۵، حدود  $10^2$  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 ( $p < 0.05$ ).

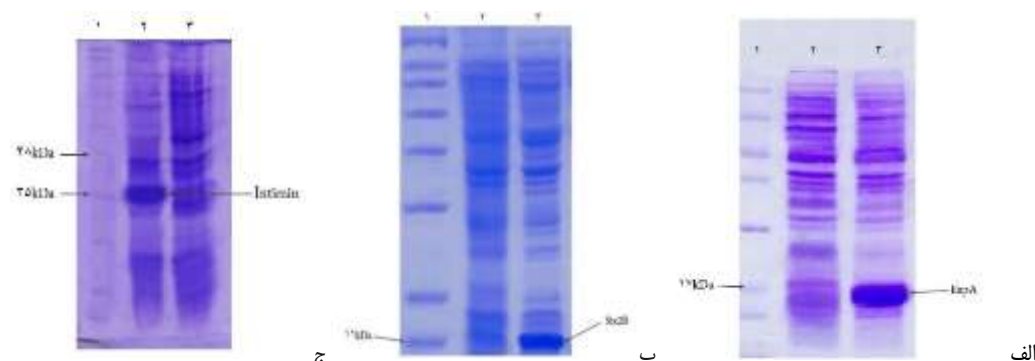
**بررسی زنده ماندن موش‌های ایمن شده:** با توجه به اینکه در بررسی میزان ریزش باکتری، موش های ایمن شده به روش زیر پوستی میزان دفع باکتری کمتری را نشان دادند لذا در این مرحله زنده مانده حیوانات فقط با حیوانات ایمن شده به روش زیر پوستی انجام شد. پس از چالش، ۱۰۰ درصد موش‌های کنترل که ایمن نشده بودند بعد از 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 ۵۰ MLD 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).

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

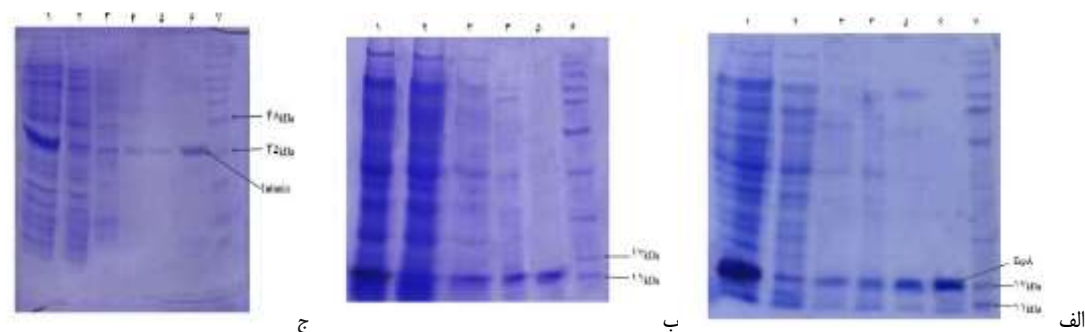
### یافته ها

**بیان و تخلیص پروتئین های نوترکیب EspA, Stx2B, Intimin:** القاء بیان با IPTG منجر به تولید پروتئین های EspA, Stx2B, Intimin به ترتیب با وزن ۱۷،۱۱ و ۳۴ کیلودالتون شد (شکل ۱). تخلیص هر کدام از پروتئین ها 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, Intimin به ترتیب ۴۲، ۴۲ و ۳۲ درصد بود (شکل ۲).

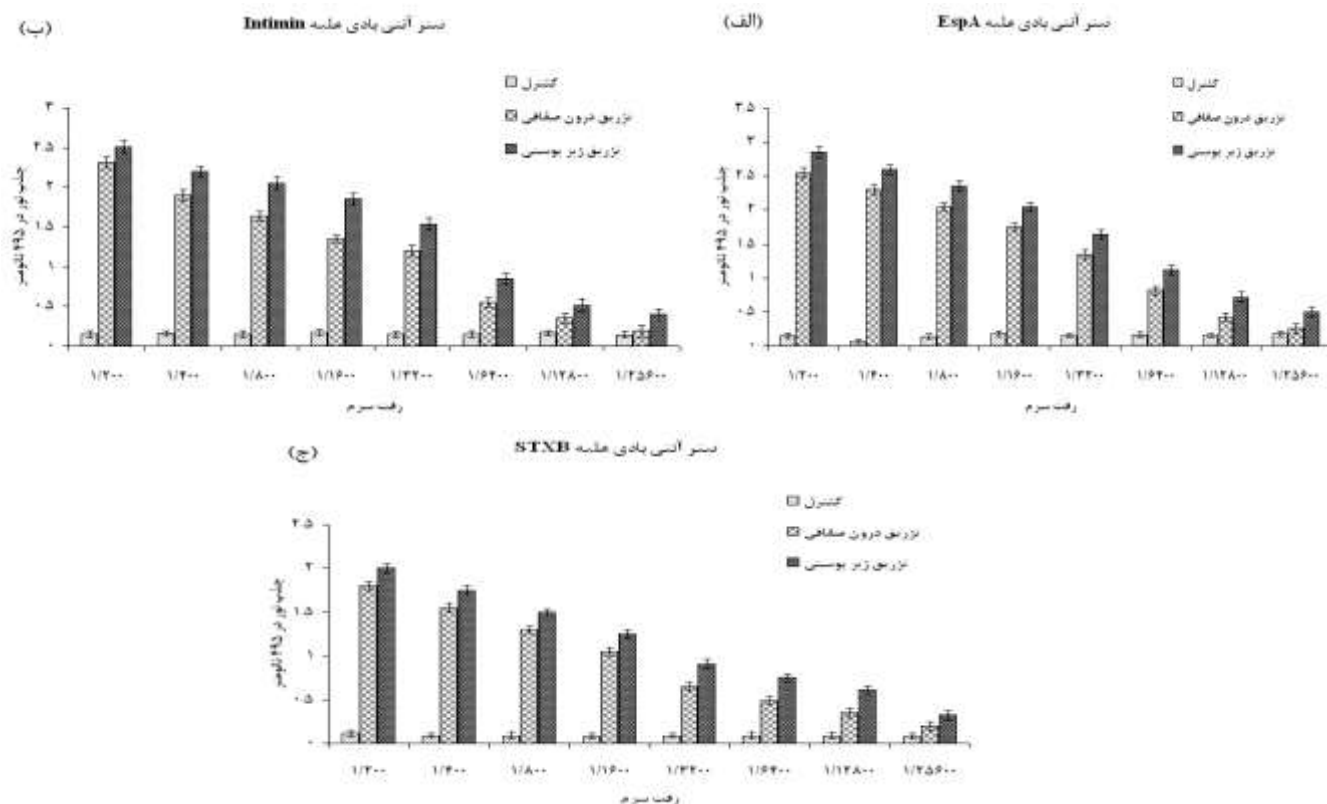
**بررسی تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین های EspA, Stx2B, Intimin:** تیتراژ پایانی الیزا برای پاسخ هومورال به EspA, Intimin و Stx2b، ۲۵۶۰۰ بود. آنتی بادی علیه هر سه جز پروتئینی تولید شد. تیتراژ آنتی بادی در رقت ۱:۲۰۰ سرم برای پروتئین های Intimin, Stx2B و EspA به ترتیب ۲/۶، ۲ و ۲/۸ بود (نمودار ۱). میانگین تیتراژ آنتی بادی علیه Stx2B کمتر از تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین های Intimin و EspA بود ( $p < 0.05$ ). تیتراژ آنتی بادی علیه EspA بالاتر از Intimin بود که از لحاظ آماری این تفاوت معنی دار نبود. تفاوت تیتراژ 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.



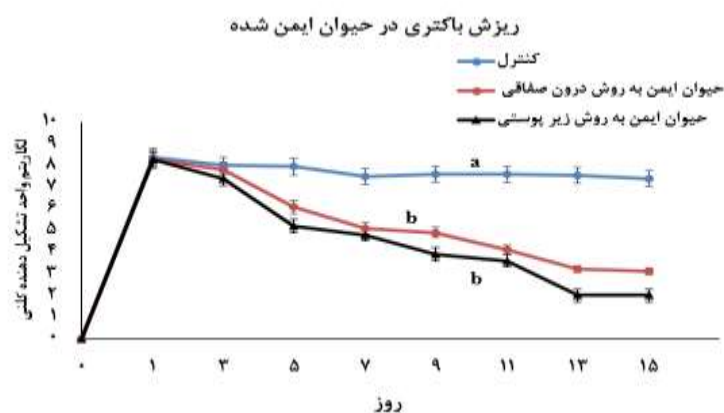
شکل ۱. بررسی بیان پروتئین های نوترکیب EspA (الف)، Stx2B (ب) و Intimin (ج) بر روی ژل SDS-PAGE. ردیف ۱- نشانگر ملکولی پروتئین، ردیف ۲- نمونه القا نشده، ردیف ۳- نمونه القا شده با IPTG



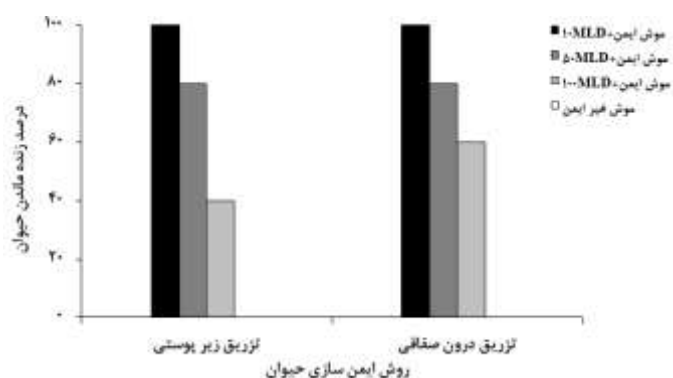
شکل ۲. بررسی تخلیص پروتئین های نوترکیب EspA (الف)، Stx2B (ب) و Intimin (ج) به روش دنا توره بر روی ژل SDS-PAGE. ردیف ۱- نمونه قبل از عبور از ستون، ردیف ۲- نمونه پس از عبور از ستون، ردیف ۳- نمونه حاصل از شستشوی ستون با بافر C، ردیف ۴- نمونه حاصل از شستشوی ستون با بافر D، ردیف ۵- نمونه حاصل از شستشوی ستون با بافر E، ردیف ۶- نمونه حاصل از شستشوی ستون با ایمیدازول ۲۵۰



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



نمودار ۲. بررسی ریزش باکتری در موش های ایمن شده به روش درون صفاقی، زیر پوستی و موش های غیرایمن پس از چالش با  $10^9$  باکتری *E.coli* O157:H7. حروف غیر همانند نشان دهنده تفاوت معنی داری است.



نمودار ۳. نتایج زنده ماندن موش های ایمن شده در چالش با  $10^9$  و  $10^5$  و  $10^2$  از باکتری *E.coli* O157:H7

## بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که پاسخ ایمنی علیه پروتئین های *Intimin*, *EspA* و *Stx2b* باعث حفاظت حیوان در چالش با *E.coli* O157: H7 می شود. با توجه به سازوکار بیماری زایی *E.coli* O157:H7 نقش اساسی پروتئین های *EspA* و *Intimin* در آغاز فرآیند لانه گزینی باکتری و ناتوان کنندگی توکسین شبه شیگا مشخص می گردد. 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 توالی های نوکلئوتیدی دقیق کدکننده پروتئین های *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 انتهایی کربوکسیل پروتئین *Intimin* در برهم کنش آن با گیرنده اش نقش دارد، لذا ۹۳۳ نوکلئوتید انتهایی 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 اسید آمینه ابتدایی آن صرف نظر شد. اما توالی کامل *Stx2B* در طراحی پروتئین نو ترکیب مورد استفاده واقع شد.

مطالعات و پژوهش های زیادی در حوزه طراحی واکسن نو ترکیب علیه پاتوژن EHEC با استفاده از فاکتور های بیماری زای آن پرداختند. از جمله این موارد می توان به پروتئین های *Stx2A*, *Stx1B* و *Stx2B* پروتئین های سیستم ترشحی نوع ۳، *Intimin*, *EspA*, *Tir*, *ferric enterobactin protein* (*FepA*) اشاره نمود (۲۲). در اکثر مطالعات انجام شده، مشخص شد که آنتی ژن های *EspA*, *Intimin* و *Stx2B* نقش مهمی را در طراحی یک کاندید واکسن مناسب ایفا می کنند. Baranvand و همکاران با بررسی ایمنی زایی پروتئین نو ترکیب *StxB* شیگلا دیستری 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 زایی 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 ۱۰<sup>۳</sup> cfu کاهش

یافت (۱۲). در تحقیق دیگری نیز Amani و همکاران ایمنی زایی پروتئین های *EspA*, *Intimi* و *Tir* را در موش بررسی کردند. در پژوهش مذکور بعد از ایمن سازی موش ها با پروتئین کایمر، میزان ۱۰<sup>۱۰</sup>cfu 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 زیرواحد B سم شبه شیگا نوع ۲ (*Stx2B*) و ایجاد ایمنی در حیوان آزمایشگاهی مشاهده کردند که سرم موش های ایمن، قادر به خنثی سازی سم می باشد و در آزمون چالش، ۶۶ درصد موش های ایمن شده زنده ماندند (۱۳).

نتایج تحقیق Kazemi و همکاران با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. هر چند در پژوهش حاضر موش های ایمن در مواجهه با ۱۰ MLD از باکتری به طور کامل زنده ماندند. Martorelli و همکاران مخلوط شامل پروتئین های نو ترکیب *Intimin*, *EspB* و *Stx2B* را به عنوان کاندیدی جهت واکسن علیه /شریشیاکلی O157:H7 به کار بردند. ترکیب پروتئینی توانست سیستم ایمنی همورال را به خوبی 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 اتصال و توکسین باکتری را مختل نماید. هر چند که بر خلاف تحقیق حاضر، Martorelli فقط ایمنی زایی 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* و *Stx2b* باعث حفاظت حیوان در چالش با *E.coli* O157: H7 می شود.

## تقدیر و تشکر

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

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

M. Taheri (BSc)<sup>1</sup>, Sh. Nazarian (PhD)<sup>\*2</sup>, F. Ebrahimi (PhD)<sup>2</sup>, M. Bakhshi (PhD)<sup>3</sup>, J. Fathi (BSc)<sup>1</sup>

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 14<sup>th</sup> 2017, Revised: Mar 14<sup>th</sup> 2018, Accepted: Mar 26<sup>th</sup> 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<sup>2</sup> 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

## 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. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Emerg Infect Dis. Clinical Case Studies (Northern 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. Baravand 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 glauca*) 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, Hatf 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.

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, Whitlam 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.