Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.44; No 4

Investigation of preformed design Acinetobacter Baumannii outer membrane protein A peptide vaccine candidate in reaction with serum antibodies from ICU staffs members

Shadi Paydarfar[1], Ali Hashemi[2], Mohammad Amin Abbasi[3], Mojgan bandehpour[4], Ali Bakhtiari[5], Fatemeh Tajik[3], Nariman Mosaffa[*6]

1. Department of Immunology School of medicine Shahid Beheshti University of Medical Sciences

2. Department of Microbiology School of medicine Shahid Beheshti University of Medical Sciences

3. Firoozabadi Hospital,Clinical Research Development Unite(FHCRDU) Iran University Medical Science(IUMS),

4. Department of Biotechnology, School of medicine Shahid Beheshti University of Medical Sciences

5. Department of Emergency Medicine, School of Medicine,Dezful University of Medical Sciences,Clinical Medical Science(IUMS)

6. Correspod Author;Department of Immunology School of medicine Shahid Beheshti University of Medical Sciences

(Received:2019/10/11 Accept:2019/12/18)

Abstract

Background: *The staff members in ICU are the major carriers with different devices such as catheters. The aim of the present study was to investigate the antibody reaction against immunogenic peptides of ompA designed as a candidate vaccine Against acinetobacter baumannii.*

Materials and method: *A total of 62 serum samples were obtained from exposed ICU staffs in Tehran Firoozabadi and Dezful Ganjavian hospitals and non-exposed individuals and patients suffering from SLE. In order to increase specificity and to decrease non-specific anti body, all the serums were pre-adsorped with E-coli Lysate. In order to determine positive reaction of samples with Acinetobacter baumannii lysate due to detection of existence of antibodies against Acinetobacter baumannii, ELISA technique was used.*

Results: *The results showed that out of 33 samples of exposed serum, 75% was positive. Also, from among 22 samples of non-exposed individuals, 27% was positive. Strongly positive serum with lysates were reacted with only peptide 5 of ompA Acinetobacter baumannii.*

Conclusion: *Obtained results showed that not only exposed samples had a lot more Ab titre in comparison to non-exposed sample, but these groups had also significant higher titer of Abs against peptide 5. In other words, it can be concluded that the colonization of Acinetobacter baumannii in population is growing year by year. More research should be carried out to demonstrate the exact role of antibody against Acinetobacter baumannii and immunologic peptides.*

Keywords: *Acintobacter bomani; Vaccine; Serum antibodies; ICU*

** Corresponding:Nariman Mosaffa*

Email:yasamaryan@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-18]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ٤٤، شماره ٤، ١٣٩٩، صفحات ٦٠٧ تا ٦١٢

مطالعه کارایی پپتیدهای طراحی شده از پروتئین غشای خارجی باکتری آسینتوباکتر بومانی کاندید واکسن در واکنش با آنتی بادی‌های سرمی پرسنل شاغل در بخش ICU بیمارستان

شادی پایدارفر[۱]، علی هاشمی[۲]، محمدامین عباسی[۳]، مژگان بنده‌پور[٤]،علی بختیاری[٥]، فاطمه تاجیک[۳]، نریمان مصفا[٦*]

۱-گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- مرکزتحقیقات توسعه بالینی بیمارستان فیروزآبادی،دانشگاه علوم پزشکی ایران
۴-گروه بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- گروه طب اورژانس ،دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول
۶- گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۸/۰۷/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۸/۰۹/۲۷

چکیده:

سابقه و هدف: کارکنان شاغل در بخش آی سی یو از جمله افرادی هستند که بیش از سایرین در معرض مواجهه با باکتری اسینتوباکتر بومانی قرار دارند. نظر به اینکه هدف از این مطالعه بررسی کارایی پنج پپتید ایمونوژنیک مشتق از پروتئین *Outer Membrane Protein A* (*ompA*) اسینتوباکتر بومانی ـ به عنوان پپتیدهای کاندید واکسن ـ بود در این تحقیق حضور آنتی بادی علیه پپتیدهای مذکور در سرم این افراد بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۶۲ نمونه خون شامل پرستاران بخش *ICU* بیمارستان گنجویان دزفول و بیمارستان فیروز آبادی تهران و همچنین افراد سالم غیر مرتبط با عفونت‌های بیمارستانی بررسی شد. سرم افراد برای کاهش آنتی بادی‌های غیراختصاصی، در مواجه با لیزات باکتری اشریشیا قرار گرفت. برای تعیین نمونه‌های مثبت از نظر وجود آنتی بادی علیه اسینتوباکتر بومانی تست الایزا با لیزات اسینتوباکتر بومانی برای تمام نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌های مثبت جدا شده و حضور آنتی بادی علیه پپتیدهای ایمونوژنیک طراحی شده، توسط الایزا ارزیابی شد.

یافته‌ها: پس از تعیین نقطه برش (*cut off*) برای تفکیک موارد مثبت و منفی مشخص شد که از ۳۳ نمونه پرستاران بخش *ICU*، ۷۵درصد دارای آنتی بادی علیه اسینتوباکتر بومانی (مثبت) و از ۲۲ نمونه نرمال غیر شاغل در مراکز بهداشتی و درمانی ۲۷درصد مثبت بودند. نتایج الایزا با استفاده از پپتیدهای ایمونوژنیک طراحی شده نشان داد که پپتید شماره ۵ بیشترین توانایی را برای واکنش با آنتی بادی موجود در سرم داراست.

نتیجه‌گیری: پرسنل شاغل در بخش های آی سی یو به دلیل در معرض قرارگرفتن مکرر و فراوان با اسینتو باکتر بومانی، واجد سطوح بالایی از آنتی بادی سرمی هستند، همچنین افراد غیر در معرض قرار گرفته نیز واجد سطوحی از آنتی بادی البته پایین‌تر از جمعیت در معرض هستند. نتایج الایزا با استفاده از پپتیدهای طراحی شده نشان داد که این پپتیدها کارایی مناسب به عنوان پپتیدهای کاندید واکسن را دارند.

واژگان کلیدی: اسینتوباکتر بومانی، واکسن، آنتی بادی‌های سرمی، *ICU*

مقدمه:

عفونت‌های بیمارستانی با منشأ باکتریال به عنوان یکی از خطرناک‌ترین تهدیدها برای سلامت جهانی محسوب می‌شوند. گزارش‌ها نشان می‌دهد که اسینتوباکتر بومانی یکی ازعلل اصلی این عفونت‌هاست. این پاتوژن عامل مواردی همچون باکتریمی، پنومونی مرتبط با ونتیلاتور، عفونت دستگاه ادراری، مننژیت و عفونت زخم جراحی در بیماران بستری به ویژه در بخش Intensive Care Unit (ICU) و Burn Care (BCU Unite) می شود(۲).

اسینتوباکتر بومانی مقاوم به دارو است و عفونت های ایجاد شده توسط این پاتوژن موجب طولانی شدن دوره بستری در بیمارستان و هزینه های سنگین درمان شده و مرگ و میر بالایی را به دنبال دارد، بنابراین ایمونوتراپی بر اساس آنتی‌بادی برای بهبود این عفونت ها پیشنهاد شده است، شناسایی یک هدف آنتی‌ژنیک برای ایمونیزاسیون

نویسنده مسئول: نریمان مصفا

پست الکترونیک: yasamaryan@gmail.com

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-18]

فعال و پاسیو علیه اسینتوباکتر بومانی یک مکانیسم معقول است که آنتی‌ژن‌های کاندید را هدف قرار می‌دهد(۳).

مطالعاتی که به شناسایی اپی توپ‌های کاندید واکسن در باکتری اسینتوباکتر بومانی پرداخته است ۴۲ کاندید واکسن را از طریق روش‌های Reverse Vaccinology و مطالعه‌های Insilico معرفی کرده است(۴).

ompA به عنوان بهترین کاندید برای تولید واکسن علیه اسینتوباکتر بومانی معرفی شد(۵).

آنتی‌ژن‌هایی که امروزه به عنوان کاندید واکسن استفاده می‌شوند، پپتیدهای موجود در ساختار پروتئینی هستند. واکسن‌های مبتنی بر پپتید سبب تمرکز سیستم ایمنی بر اپی‌توپ‌های مربوطه و جلوگیری از پاسخ‌های غیرحفاظتی و عوارض جانبی ناخواسته مانند بیماری‌های خود ایمنی می شوند. در نتیجه واکسن‌های مبتنی بر پپتید امید تازه‌ای برای درمان و پیشگیری از بیماری‌های عفونی مزمن هستند(۶).

مطالعه‌ای که به دنبال نتایج MOLDITOF اسپکتروسکوپی، پروتئین ompA=outer membrane protein A را به عنوان پروتئین غالب ایمونوژن معرفی و توالی آن را مشخص کرد، پپتیدهای ایمونوژنیک پروتئین OmpA را تعیین کرد(۷, ۸) که مشخصات این پپتیدها در جدول زیر بیان شده است.

شماره	توالی	طول توالی
۱	YVLLGAGHYKYDFDGVNR	۱۸
۲	LRVFFDTNKSNIKDQY	۱۶
۳	VTVTPLLLGYTFQDSQHNNGGKDGNLT	۲۷
۴	HLKPAAPVVEVAPVEPTPVAPQPQEL	۲۶
۵	ICLTGGGLRVFFDTNKSNIKDQYGGGTLCI	۳۰

حال بر اساس مطالعه‌های انجام شده و اهمیت عفونت‌های بیمارستانی و لزوم ایجاد راهی برای جلوگیری از این عفونت‌ها، با توجه به نتایج رضایت بخش مطالعه حیوانی روی پپتیدهای ایمونوژنیک پروتئین OmpA طراحی شده، لازم است که این پپتیدها در مواجه با سرم انسانی نیز تحت بررسی قرار گیرند تا میزان واکنش آن‌ها در رابطه با آنتی بادی های انسانی مشخص شود.

مواد و روش ها:

سه گروه تحت بررسی در این تحقیق شامل:

پرستاران بخش آی سی یو (Exposed). ۳۳ نمونه خون از این گروه مورد ارزیابی سطح آنتی بادی سرمی علیه اسینتوباکتر بومانی و پپتیدهای ایمونوژنیک طراحی شده از پروتئین ompA این پاتوژن قرار گرفت. از ۳۳ نمونه مورد بررسی، ۱۶ نمونه از پرستاران بخش ICU بیمارستان گنجویان دزفول و ۱۷ نمونه از پرستاران بخش ICU بیمارستان فیروزآبادی تهران گرفته شد.

افراد سالم جامعه که سابقه بیماری ناشی از اسینتوباکتر بومانی و هرگونه زمینه مستعد برای وقوع این عفونت از جمله بستری در بخش آی سی یو و همچنین سابقه کار در مراکز بهداشتی و درمانی را نیز نداشته‌اند (Non Exposed). ۲۳ نمونه خون از این گروه برای تعیین سطح آنتی‌بادی سرمی علیه اسینتوباکتر بومانی و پپتیدهای طراحی شده ارزیابی شد.

تهیه لیزات باکتری:

برای تهیه لیزات باکتری، از کشت تازه اسینتوباکتر بومانی و اشریشیا که به صورت کشت شبانه تهیه شده بود، به میزان نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ CFU/ml) جدا شده و با آب مقطر ۱/۵ برابر رقیق شد تا میزان باکتری مورد نظر به 10^8 CFU/ml برسد. برای تعیین غلظت پروتئین لیزات باکتری برای الایزا به میزان مورد نظر از تست برادفورد استفاده شد(۸).

پیش جذب سرم‌ها با پروتئین‌های لیزات باکتری اشریشیا:

برای افزایش دقت، اختصاصیت و حساسیت آزمون سنجش حضور آنتی بادی، تمامی سرم‌های مورد سنجش در اندازه‌گیری آنتی بادی علیه پروتئین‌های لیزات باکتری و پپتیدهای ایمونوژنیک، با لیزات باکتری *E.coli* مورد انجام Antibody adsorption test control for proteins قرارگرفتند. این کار به دلیل حذف آنتی بادی‌های از پیش تشکیل یافته در سرم‌های تحت بررسی انجام می‌شود. حضور آنتی بادی علیه گروه انتروباکتریاسه می‌تواند واکنش‌های متقاطع را در این مطالعه به ظهور برساند که اسینتو باکتر بومانی نیز عضوی از این گروه است(۹).

مراحل پیش جذب سرم ها:

میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از سرم با ۰/۵ میلی‌لیتر از لیزات سانتریفیوژ نشده باکتری *E.coli* در انکوباتور شیکردار (۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت) با ریتم کند قرار داده شد. مخلوط سرم‌ها و لیزات باکتری در طول شب در یخچال (۴درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شد.

پس از گذشت زمان مورد نیاز مخلوط در دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد.

آنتی بادی‌های سرم‌ها که علیه آنتی ژن‌های باکتری *E.coli* بودند به آنتی ژن‌ها متصل شده و در این فرآیند ته‌نشین می‌شوند. مایع رویی به عنوان سرمی فاقد آنتی بادی‌های علیه *E.coli* جدا و استفاده شد.

بررسی حضور آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های لیزات اسینتوباکتربومانی و پپتیدهای ایمونوژنیک پروتئین ompA طراحی شده از اسینتوباکتربومانی به روش الایزا:

برای تعیین مناسب‌ترین غلظت آنتی‌ژن برای پوشش گذاری (Coating)پلیت الایزا، غلظت‌های سریالی از ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر تا غلظت ۱۵ میکروگرم در میکرولیتر از آنتی‌ژن در چاهک‌های پلیت الایزا Coat شد.

انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به صورت over night انجام شد و شست‌وشو با بافر سه بار انجام شد.

برای بلوکه کردن، حجم ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ درصد حاوی BSA (Bovine Serum Albumin) به هر چاهک اضافه شده و به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و دوباره شست‌وشو سه بار با بافر شست‌وشو انجام شد.

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سرم کنترل مثبت (بیمار شفا یافته از عفونت اسینتوباکتربومانی در آی سی یو که داشتن آنتی بادی علیه آسینتوباکتر با ایمونوبلاتینگ تایید شده بود) به صورت پیش جذب شده و پیش جذب نشده با رقت‌های ۱/۲، ۱/۲۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۵۰۰ تهیه شد و نمونه منفی به عنوان کنترل منفی نیز با رقت‌های مشابه اضافه شد، به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه و مراحل انجام شد.

انکوباسیون یک ساعته با آنتی بادی کنژوگه با HRP در دمای محیط انجام شد.

شست‌وشو انجام شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر TMB به‌عنوان سوبسترا اضافه شده و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه شد تا رنگ حاصله تثبیت شود.

نتایج با دستگاه الایزاریدر در طول موج ۶۲۰/۴۵۰ نانومتر قرائت شد(۷).

بعد از مراحل setup آزمایش، سایر نمونه‌ها به صورت پیش جذب شده و پیش جذب نشده در رقت ۱/۲۰ سرم و غلظت دو میکروگرم آنتی‌ژن برای انجام این آزمون با لیزات باکتری و همچنین رقت ۱/۱۰ سرم و غلظت ۱۰ میکروگرم آنتی ژن برای انجام این آزمون با پپتیدهای ایمونوژنیک پروتئین ompA طراحی شده از اسینتوباکتربومانی، بررسی شد. سایر مراحل انجام الایزا طبق پروتکلهای استاندارد انجام شد.

بررسی بیوانفورماتیک پپتیدهای انتخابی:

الف) بررسی شکل فضایی پپتیدها:

پپتیدهای ایمونوژنیک پروتئین ompA طراحی شده از اسینتوباکتر بومانی با استفاده از سرور PEP-FOLD از نظر ساختار فضایی بررسی شدند. این سرور قادر به پیش‌بینی ساختار پپتیدها از پنج تا ۵۰ اسید آمینه است. برای انجام این بررسی، ابتدا وارد آدرس http:// mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD شده در بخش input Data توالی پپتید را paste کرده و با RUN کردن سرور، آنالیز پپتید آغاز شود.

ب) بررسی میزان اتصال یا اتصال بهتر هر یک از پپتیدها به آنتی بادی:

با استفاده از سرور HPEPDOCK پیش‌بینی اتصال پپتیدها و آنتی بادی IgG انسانی بررسی شد. این سرور پیش‌بینی اتصال لیگاند و رسپتور که در این جا لیگاند همان پپتید و رسپتور همان آنتی بادی IgG انسانی بود را با محاسبه عدد داک انجام می‌دهد.

تجزیه و تحلیل آماری:

برای مقایسه بین میانگین‌ها در این مطالعه از تی مستقل (Independent- sample T

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-18]

test) استفاده شد. نتایج حاصل به صورت میانگین خطای استاندارد گزارش شده است. برای تعیین Cut Off از نمودار ROC استفاده شد. مقدار P value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان آستانه معنادار برای تمام پارامترها در نظر گرفته شد.

یافته ها:

نتایج دموگرافیک افراد تحت بررسی:

مشخصات دموگرافیک افراد تحت بررسی شامل گروه افراد در معرض، افراد غیر در معرض و افراد مبتلا به لوپوس شامل: سن و توزیع جنسی در جدول شماره یک آورده شده است.

میانگین سابقه کار در بخش ICU برای گروه در معرض حداکثر ۱۲ سال و حداقل دو سال بود.

جدول شماره ۱) نتایج دموگرافیک افراد تحت بررسی

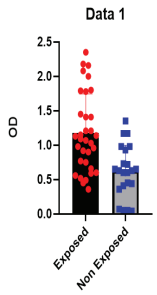
گروه‌های تحت بررسی	سن	جنس F/M
در معرض	۶±۳۴	۲۹/۴
غیر در معرض	۴±۳۰	۹/۱۳
لوپوس	۱۶±۳۲	۷/۰

نتایج انجام پیش جذب سرم‌های هر دو گروه Exposed و Non Exposed با پروتئین‌های لیزات باکتری اشریشیا در واکنش با پروتئین‌های لیزات اسینتوباکتر بومانی:

با مقایسه OD سرم‌های پیش جذب شده با لیزات باکتری اشریشیا کلی و همین سرم‌ها در حالت پیش جذب نشده مشخص شد که میزان OD سرم‌ها در حالت پیش جذب شده به شکل معناداری کاهش می‌یابد؛ به طوری که میانگین OD سرم‌های پیش جذب شده برابر با ۰/۹ و OD سرم‌های پیش جذب نشده برابر ۱/۳ بود و P=0/001 محاسبه شد. این یافته نشان داد که آنتی بادی‌های با واکنش متقاطع با آنتی ژن‌های مشترک با گروه انتروباکتریاسه در مرحله مواجهه حذف شدند و امکان وقوع موارد مثبت کاذب با آنتی ژن‌های لیزات اسینتوباکتربومانی کاهش یافت که در نهایت بر اختصاصیت شناسایی آنتی بادی‌ها در واکنش آزمون الایزا تأثیر می‌گذارد.

همچنین مقایسه میزان آنتی‌بادی سرمی علیه پروتئین‌های اسینتوباکتر بومانی بین دو گروه Exposed و Non Exposed نشان داد که میانگین OD برای نمونه‌های گروه Exposeed برابر ۱/۱۸ و این میانگین برای نمونه‌های گروه Non Exposed برابر ۰/۶۲ محاسبه شد. داده‌های این دو گروه در مقایسه با هم دارای اختلاف معنادار بودند به طوری که P=0.0002 محاسبه شد.

این یافته‌ها در نمودار یک مشخص است.



نمودار ۱) میزان آنتی بادی سرمی علیه پروتئین‌های اسینتوباکتر بومانی در دو گروه Exposed و Non Exposed

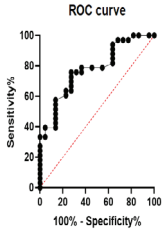
تعیین CUT OFF :

با وجود این که نتایج تست‌های الایزای انجام شده نیمه کمی است و به صورت مثبت و منفی گزارش می‌شوند، باید توجه داشت که برای تحلیل و تعریف نتایج تست‌های این چنینی باید مقدار عددی مشخص شود که با توجه به آن نمونه‌ها به نتایج مثبت یا منفی دسته‌بندی شوند و نتایج به این ترتیب از هم تفکیک شوند. این مقدار عددی در اصطلاح Cutoff نامیده می‌شود و محدوده مثبت یا منفی بودن نتایج بر اساس بزرگ‌تر یا کوچک‌تر بودن از مقدار عددی CUT OFF تعریف و گزارش می‌شوند.

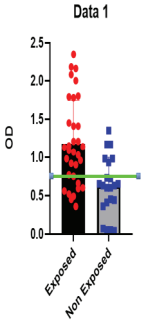
تعیین CUT OFF با استفاده از نمودار ROC(Receiver Operating Characteristic Curve) تعیین شد.

این نمودار توصیف تصویری عملکرد تست تشخیصی است که نشان‌دهنده حساسیت تشخیصی ، اختصاصیت تشخیصی و میزان وقوع مثبت کاذب است. مساحت زیر نمودار ROC که به اختصار AUC (Area Under the receiver operating characteristic Curve) نامیده می‌شود، نشان دهنده توانایی تست در دسته بندی و تشخیص نمونه های بالینی از نظر وجود یا عدم وجود مسئله مورد بررسی است. این سطح نوعی اندازه گیری تکمیلی است که امکان بررسی احتمال عدم قطعیت در تشخیص را فراهم می کند. لازم به ذکر است مساحت کلی زیر نمودار ROC برابر یک است زیرا محدوده اعداد هر دو محور عمودی (میزان شیوع مثبت واقعی) و محور افقی (میزان شیوع مثبت کاذب) از عدد صفر تا یک است(نمودار۲).

با مقایسه OD سرم های پیش جذب شده گروه Exposed با OD سرم های پیش جذب شده گروه CUT OFF، Non Exposed برابر ۷۴ درصد محاسبه شد که این مقدار دارای حساسیت ۷۶درصد و اختصاصیت ۷۳درصد بود. با توجه به CUT OFF تعیین شده از ۳۳ نمونه پرستاران بخش ICU، ۲۵ نمونه مثبت (۷۵درصد) و ۸ نمونه منفی بودند. همچنین از ۲۲ نمونه نرمال غیر شاغل در مراکز بهداشتی و درمانی، ۶ نمونه مثبت (۲۷درصد) و ۱۶ نمونه منفی بودند (نمودار ۳).



نمودار ۲) تعیین ارزش نقطه برش سطح سرمی آنتی‌بادی ضد آسینتوباکتر بین دو گروه افراد نرمال غیر شاغل در مراکز بهداشتی و درمانی و پرستاران بخش ICU به لحاظ اختصاصیت و حساسیت



نمودار۳) میزان CUT OFF تعیین شده برابر با ۰/۷۴ با استفاده از نمودار ROC (خط سبز رنگ) بین دو گروه Exposed و Non Exposed

بررسی واکنش آنتی بادی با پپتیدها در نمونه‌های سرمی که نسبت به لیزات اسینتوباکتربومانی دارای تیتر آنتی‌بادی مثبت بودند:

نتایج آزمون الایزا برای هر پنج پپتید در دست بررسی با ملاحظه کات آف تعیین شده توسط نمونه‌های مثبت سرمی با لیزات باکتری نشان داد که تنها پپتید شماره پنج واجد واکنش معنادار با سرم‌های مثبت به لحاظ واکنش با لیزات پیکره باکتری بود. به این ترتیب ایمونوژن‌ترین پپتید، از بین پپتیدهای طراحی شده در عمل مشخص شد، در

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-18]

مقایسه پاسخ نمونه‌های مثبت نسبت به لیزات اسینتوباکتر بومانی در حالت پیش جذب شده، با پاسخ همین نمونه‌ها نسبت به پپتید شماره پنج، تفاوت معناداری مشاهده نشد و تمامی سرم‌های با واکنش مثبت با لیزات اسینتوباکتر بومانی، قادر به شناسایی پپتید پنج نیز بودند. اختلافی نیز بین میانگین وانحراف معیار سطوح OD هریک از واکنش‌ها وجود نداشته است به طوری که P=0.948 محاسبه شد.

بررسی واکنش آنتی بادی سرمی با پپتید شماره ۵ در نمونه‌هایی که با لیزات اسینتوباکتر دارای تیتر آنتی بادی منفی بودند:

برای اطمینان از صحت پاسخ نمونه‌ها نسبت به پپتید انتخاب شده، مواجهه چند مورد از نمونه‌های منفی نسبت به لیزات اسینتوباکتربومانی، با پپتید پنج بررسی شد.

مقایسه پاسخ ۱۰ مورد از نمونه‌های منفی نسبت به لیزات اسینتوباکتر بومانی در حالت پیش جذب شده، با پاسخ همین نمونه‌ها نسبت به پپتید شماره پنج، تفاوت معناداری مشاهده نشد به طوری که هیچ‌کدام از سرم‌های با واکنش زیر کات آف در مورد لیزات باکتری، با آنتی ژن پپتید نیز واکنش نشان ندادند. اختلاف بین OD این نتایج در دو واکنش معنادار نبود به طوری که P=0/956 محاسبه شد.

بررسی نتایج پیش جذب سرم نمونه‌ها با پروتئین‌های باکتری اشریشیا کلی در پاسخ به پپتیدها:

بررسی ها نشان داد که در واکنش نمونه‌ها با پپتیدها، بین پاسخ نمونه‌ها در حالت پیش جذب شده با همان نمونه‌ها در حالت پیش جذب نشده تفاوت معناداری وجود ندارد. میانگین OD نمونه‌ها در حالت مواجه شده در واکنش با پپتید ۱/۳۳۱ و میانگین OD همین نمونه‌ها در حالت غیر مواجه ۱/۳۳۳ محاسبه شد. همچنین P= 0/975 محاسبه شد.

بررسی واکنش آنتی بادی با پپتید شماره ۵ در نمونه‌های سرمی افراد مبتلا به لوپوس : بررسی های انجام شده نشان داد که مواجه سرم افراد مبتلا به لوپوس با پپتید شماره ۵، واکنشی از آنتی بادی با پپتید را سبب می شود که مقایسه میانگین OD آن با OD سرم افراد مثبت به لحاظ واکنش با لیزات اسینتوباکتر بومانی در مواجهه با همین پپتید تفاوت معناداری را نشان نداد به طوری که P=0/929 محاسبه شد.

بحث:

مطالعه‌های زیادی در رابطه با اسینتوباکتر بومانی انجام شده که پاسخ ایمنی نسبت به این باکتری را بررسی کرده‌اند که بسیاری از آن ها به نقش مهم آنتی بادی در پاسخ به این پاتوژن اشاره کرده‌اند. از دلایل تمرکز مطالعه‌ها و پژوهش‌ها برروی روش‌های مبتنی بر Non antibiotic based intervention strategies ، مقاومت گسترده جهانی در مقابل طیف عظیمی از آنتی بیوتیک‌ها در اسینتوباکتر بومانی بوده است(۱۰, ۱۱).

دلیل اصلی برای انتخاب پپتیدهای طراحی شده از مجموعه ompA در این پژوهش، گسترش مقاله‌ها و تحقیق‌ها در مورد این ساختار و پذیرش آن به عنوان اصلی‌ترین کاندید واکسن است(۵, ۱۲).

در بساری از مقاله‌ها و پژوهش‌ها با استفاده از تکنیک الایزا و بررسی سطح سرمی آنتی بادی‌های اختصاصی به نقش پر اهمیت این آنتی بادی‌ها در محافظت و مصونیت علیه انواع عفونت‌های حاصل از اسینتوباکتر بومانی پرداخته است(۱۳, ۱۴).

اساس انتخاب نمونه‌های تحت بررسی در این تحقیق، استفاده از داوطبان شاغل در بخش ICU بیمارستان‌ها بوده است. با توجه به سوابق شغلی به نظر می‌رسد که پرسنل ICU در تماس طولانی‌مدت با نمونه‌های بیمار و انواع وسایل و تجهیزات پزشکی هستند که در مراجع و منابع به عنوان علل اصلی آلودگی و انتشار اسینتوباکتر بومانی محسوب می‌شوند. سعی شد به لحاظ سن داوطلبان رعایت هماهنگی بین نمونه‌ها وجود داشته باشد. با توجه به این که تمامی داوطلبان فاقد موارد تماس با تجهیزات و منابع بیمارستانی و آزمایشگاهی به عنوان نمونه‌های کنترل در نظر گرفته بودند، هماهنگی بین سنین این گروه از داوطلبان نیز در نظر گرفته شد.

در مورد بیماران مبتلا به لوپوس امکان چنین هماهنگی وجود نداشت زیرا اهمیت اصلی، بررسی موارد واکنش متقاطع سرمی آن‌ها با پپتیدهای تحت مطالعه بوده است و از طرفی وقوع سنی بیماری لوپوس، پراکندگی و تنوع بسیاری را در بر می‌گیرد. به لحاظ اولیه بودن مراحل شروع بیماری، محدودیت‌هایی را در رابطه با هماهنگی سن داوطلبان ایجاد می‌کرد، اما تمام بیماران مبتلا به لوپوس از لحاظ دارا بودن شاخص‌های اصلی اختلال خود ایمنی و حضور اتو آنتی بادی‌ها تایید شدند.

در مرحله اول لازم بود تا سرم‌های تحت بررسی به لحاظ واکنش متقاطع با انتروباکتریاسه (ترجیحا باکتری اشریشیا) برای پیش جذب مورد غربالگری قرار گیرند تا آنتی بادی‌های با واکنش متقاطع حذف شوند. برای تایید صحت این روش از حذف آنتی بادی‌های متقاطع، هر دو سرم‌های پیش جذب شده و پیش جذب نشده در آزمون الایزا و برای تعیین واکنش با پیکره اسینتوباکتر بومانی و نیز لیزات اسینتوباکتر بومانی مقایسه و سنجش شد. تایید پیش جذب در آزمون الایزا از پیکره باکتری اشریشیا نیز دوباره برای کنترل آزمایش استفاده شد. نتایج حاصل از این مرحله نشان داد که تکنیک پیش جذب با آنتی ژن‌های مشترک به خوبی توانسته است آنتی بادی‌های با واکنش متقاطع را از محدوده واکنش حذف کند. پس از اطمینان از کارایی روش پیش جذب به تفسیر نتایج حاصله از مقایسه سطح سرمی واکنش دو گروه Exposed و Non Exposed می پردازیم.

این مرحله شامل بررسی واکنش آنتی بادی‌های سرمی علیه پیکره اسینتوباکتر بومانی بود تا بتوانیم در این مرحله تمامی سرم‌های با واکنش مثبت علیه پیکره و لیزات باکتری را تعیین کنیم تا در مرحله بعد سرم‌های مثبت به لحاظ واکنش فوق در مجاورت پپتیدهای کاندید، تحت آزمون الایزا قرار گیرند. در واقع انتخاب سرم‌های با واکنش مثبت واجد اهمیت بود زیرا هدف ما تعیین میزان آنتی ژنسیته پپتیدهای طراحی شده بود.

با وجود واکنش مثبت تعدادی از سرم‌های افراد غیر در معرض که بخشی از تفاوت این نتایج را با مطالعه پیشین(۱) نشان داد، باز هم شاهد اختلاف معنادار بین موارد مثبت از گروه پرسنل بخش ICU با گروه کنترل بدون سابقه تماس بودیم که نشان‌دهنده این است که ۱- اختلاف سطح کات آف این دو گروه رانشان می‌دهد و ۲- نشان دهنده بالا رفتن سطح آلودگی در جامعه است.

پس از غربالگری اولیه سرم‌های تحت بررسی با استفاده از آنتی ژن‌های پیکره‌ای و لیزات باکتری، بر اساس هدف اصلی تحقیق، این بار تست الایزا را با استفاده از پنج مجموعه از پپتیدها انجام دادیم.

نتایج حاصله از این مرحله، وقوع واکنش مثبت را با پپتید شماره پنج نشان داد که در پژوهش پیشین توسط محققان نیز این پپتید یکی از پپتیدهای با بالاترین کارایی در ایمونیزاسیون موش‌های C57B/6 در تولید آنتی بادی‌های حفاظتی بوده است(۷).

در مرحله انجام آزمون الایزا بر مبنای واکنش سرمی نمونه‌های واجد آنتی‌بادی علیه پپتید شماره پنج با هدف مقایسه هر دو روش پیش جذب و غیر پیش جذب با باکتری اشریشیا، نتایج نشان داد که سرم افراد چه در حالت پیش جذب شده و چه غیر پیش جذب، واکنش مشابهی را در مقایسه با یکدیگر نشان می‌دهند به طوری که تفاوت بین آن‌ها بسیار ناچیز و غیر معنادار گزارش شد. این یافته نشان می‌دهد که اختصاصیت پپتید شماره پنج در واکنش با آنتی بادی سرمی ضد اسینتوباکتر بومانی اختصاصی است و این آنتی بادی‌های سرمی قادر به شناسایی پپتید شماره پنج هستند. در نتیجه این پپتید واجد ساختار آنتی ژنیک قوی از مجموعه پپتیدهای اسینتوباکتر بومانی است.

در بخشی از مطالعه حاضر، به دلیل امکان واکنش متقاطع برخی سرم‌ها با پپتید کاندید شماره پنج که در افراد گروه Exposed و Non Exposed مثبت گزارش شده بود، ملاحظه شد که افراد مبتلا به لوپوس که به خصوص با توجه به شرایط شرایط زندگی، فاقد تماس روزانه با مکان‌های آلوده بوده‌اند نیز واجد واکنش مثبت با پپتید مورد نظر شدند. در این جا دو حالت وجود دارد تا بتوان حضور مثبت این آنتی بادی ضد پپتید را تفسیر کرد: اول این که ممکن است مانند سایر افراد در معرض و آن تعداد مثبت از افراد غیر در معرض که واکنش ضعیفی به آنتی ژن‌های پیکره‌ای داشتند، این بیماران نیز واجد آنتی بادی بوده‌اند؛ یا این که به دلیل بیماری و به خصوص ناهنجاری در پاسخ‌های ایمنی هومورال و افزایش تولید آنتی‌بادی واجد یک واکنش متقاطع مثبت با پپتید مورد نظر ما هستند که مورد اخیر بحث برانگیزتر بوده و نشان می‌دهد که شاید پپتید مربوطه نمی‌تواند خیلی اختصاصی برای تمام نمونه‌های مشکوک به حضور آنتی بادی عمل کند که این برای آینده این تحقیق در زمینه تهیه و تولید کیت تشخیصی می‌تواند مشکلاتی را ایجاد کند؛ هرچند که در مسیر استاندارد کردن کیت‌های تشخیصی آنتی بادی، نکاتی ویژه در نظر گرفته می‌شود تا به حداقل واکنش متقاطع با سرم‌های مشکوک دستیابی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-18]

شود. البته نظر دقیق و مستند در این مورد نیازمند تعداد بیشتری از نمونه‌های مبتلایان به بیماری‌های خود ایمن است.

پس از بررسی وجود آنتی‌بادی از کلاس IgG علیه پپتیدهای طراحی شده و همچنین بررسی قدرت آن‌ها در انجام پدیده اوپسوفاگوسیتوز، به بررسی بیوانفورماتیک پپتیدهای طراحی شده پرداخته شد.

بررسی میزان سطح انرژی اتصال آنتی‌ژن (پپتیدهای طراحی شده) با آنتی‌بادی‌های انسانی (Docking) نشان داد که این شناسه برای هر پنج پپتید بسیار مشابه و نزدیک به هم است. لازم به ذکر است که تمام پپتیدها پس از بررسی‌های بیوانفورماتیک طراحی شده بودند و از بهترین توالی‌ها برای ایمنی‌زایی و از بهترین کاندیدها برای تولید واکسن هستند. بنابراین نزدیک بودن عدد Docking آن‌ها دور از انتظار نبود اما به دلیل عوامل مختلف در In Vitro مثل استفاده از بافرها و سایر شرایط انجام آزمایش، مشاهده شد که پپتید شماره پنج با توالی ICLTGGGLRVFFDTNKSNIKDQYGGGTLCI بیشترین واکنش را با آنتی بادی‌های سرم انسان دارد. علاوه بر این، این پپتید به دلیل دارا بودن سه اسید آمینه گلایسین در بین اسیدآمینه‌های ابتدایی و همچنین اسیدآمینه‌های انتهایی دارای شکل فضایی مناسب برای شناسایی توسط آنتی‌بادی است. همچنین این پپتید دارای تعداد بیشتری از اسیدآمینه‌های لوسین و ایزولوسین در بین توالی خود، نسبت به توالی سایر پپتیدهاست. مشخص شده که این دو اسیدآمینه در تحریک سیستم ایمنی همورال نقش مؤثری دارند(۱۵).

نتیجه‌گیری :

یافته‌های این تحقیق نشان داد که نه تنها پرسنل شاغل در بخش‌های ICU به دلیل در معرض قرارگرفتن مکرر و فراوان با اسینتو باکتر بومانی، واجد سطوح بالایی از آنتی بادی سرمی هستند، بلکه افراد غیر در معرض قرار گرفته نیز واجد سطوحی البته پایین‌تر از جمعیت در معرض هستند. این یافته با سابقه پیشین این پژوهش که نشان‌دهنده نبود آنتی بادی علیه اسینتوباکتر بومانی در سرم افراد غیر در معرض بود(۱)، متفاوت بود که دلیل آن علاوه بر سپری شدن زمانی حدود چهار سال، نشان‌دهنده گسترش رو به افزایش کلونیزاسیون باکتری در سطوح بیوتیکی انسان‌هاست. هرچند اثبات این نظریه و نیز استفاده از این روش سنجش سطح تماس با سطوح آلوده که به عنوان سرواپیدمیولوژی اسینتوباکتر اطلاق شود نیاز به تعداد بسیار بیشتری از نمونه‌های در معرض است.

از آنجا که شاهد واکنش معنادار آنتی بادی‌های سرمی با لیزات باکتری و پپتید مشتق از پروتئین ompA بودیم، شاید بتوان با تلاش بیشتر از این فرآیند برای تهیه کیت آزمایشگاهی مناسب برای تعیین سطح ایمنی افراد در خطر و یا حتی بستری در بیمارستان و به خصوص بخش ICU استفاده کرد و یا تاثیر پپتیدهای طراحی شده در استراتژی‌های درمانی این بیماران را به اثبات رساند.

منابع:

1. Mosaffa N, Nafarieh T, Bandehpour M, Gachkar L, Taheri S, Hashemi A, et al. The study of serum antibody level in patients with Acinetobacter baumanni infection and comparing with healthy people and intensive care unit personnel. Pajoohandeh Journal. 2015;20(3):171-80.

2. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clinical microbiology reviews. 2008;21(3):538-82.

3. Vahdani P, Yaghoubi T, Aminzadeh Z. Hospital acquired antibiotic-resistant Acinetobacter baumannii infections in a 400-bed hospital in Tehran, Iran. International journal of preventive medicine. 2011;2(3):127.

4. Chopra S, Torres-Ortiz M, Hokama L, Madrid P, Tanga M, Mortelmans K, et al. Repurposing FDA-approved drugs to combat drug-resistant Acinetobacter baumannii. Journal of antimicrobial chemotherapy. 2010;65(12):2598-601.

5. Chen W. Current advances and challenges in the development of Acinetobacter vaccines. Human vaccines & immunotherapeutics. 2015;11(10):2495-500.

6. Hailemichael Y, Overwijk WW. Peptide-based anticancer vaccines: The making and unmaking of a T-cell graveyard. Oncoimmunology. 2013;2(7):e24743.

7. Kobra Mehdinejadiani MB, Ali Hashemi, Mohammad mehdi ranjbar, Sodabeh Taheri3, Seyed Amir Jalali1, Nariman Mosaffa1. In silico design and validation of Acinetobacter baumannii Outer membrane protein A antigenic peptides as Vaccine Candidate 2019.

8. Nafarieh T, Bandehpour M, Hashemi A, Taheri S, Yardel V, Jamaati H, et al. Identification of antigens from nosocomial Acinetobacter baumannii clinical isolates in sera from ICU staff and infected patients using the antigenome technique. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017;33(10):189.

9. El DD, Metwally T. Adsorption Technique in Pre-Transfusion Testing For Patients with Warm Type Autoimmune Hemolytic Anemia. The Egyptian journal of immunology. 2017;24(2):47-51.

10. Nielsen TB, Pantapalangkoor P, Luna BM, Bruhn KW, Yan J, Dekitani K, et al. Monoclonal antibody protects against Acinetobacter baumannii infection by enhancing bacterial clearance and evading sepsis. The Journal of infectious diseases. 2017;216(4):489-501.

11. Al-Rawi NF. Detection of Antibodies Against Lipopolysaccharide of the two Species of Acinetobacter Which Isolated from Clinical Materials by Using Indirect Haemagglutination Test. Medical Journal of Tikrit. 2005;2(112):87-91.

12. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Hujer AM, Taracila MA, et al. Acinetobacter baumannii rOmpA vaccine dose alters immune polarization and immunodominant epitopes. Vaccine. 2013;31(2):313-8.

13. Huang W, Yao Y, Long Q, Yang X, Sun W, Liu C, et al. Immunization against multidrug-resistant Acinetobacter baumannii effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. PloS one. 2014;9(6):e100727.

14. Yuan W-L, Shen Y-J, Deng D-Y. Sex bias of Acinetobacter baumannii nosocomial infection. American journal of infection control. 2018;46(8):957-8.

15. Calder PC. Branched-chain amino acids and immunity. The Journal of nutrition. 2006;136(1):288S-93S.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-12-18]