مقاله پژوهشی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال بیست و ششم/شماره ۸۸/بهار ۱۳۸۷

# تأثیر ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، فروند و واکسن ثلاث در تولید آنتی‌بادی ضد استافیلوکوکوس اورئوس کپسول‌دار Type 5 در خرگوش

دکتر سید اصغر هوایی*، دکتر اکبر میرصالحیان**، فرزانه بازرجانی***،
دکتر احمد قوامی نژاد****، کبری بامداد*****، فرخنده پورسینا******، دکتر حسن تمیزی‌فر*.

* دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
** دانشیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
***** مربی گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
****** کارشناس ارشد گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

**تاریخ دریافت:** ۸۶/۶/۴
**تاریخ پذیرش:** ۸۶/۱۱/۱۸

## چکیده

**مقدمه:** پژوهش‌های پیشین نشان داده که آنتی‌بادی‌های ضد استافیلوکوکوس اورئوس کپسول‌دار تایپ ۵، موجب افزایش قابل توجهی در ایمنی خرگوش‌ها نشده است؛ یافتن ادجوانتی مناسب برای افزایش چشم‌گیر تیتر آنتی‌بادی برای تهیه‌ی واکسن ضد این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه، اثر ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، فروند و واکسن ثلاث (DTP) در افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه این باکتری در خرگوش مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش‌ها:** ۳۰ راس خرگوش سفید نر بالغ از نژاد نیوزلندی تهیه و به طور تصادفی به۶ گروه تقسیم شدند. به گروه‌های مختلف سوسپانسیون کشته شده استافیلوکوکوس اورئوس کپسول دار تیپ ۵ بدون ادجوانت، با هیدروکسید آلومینیوم، با ادجوانت فروند (در تزریق اول ادجوانت کامل و در تزریق دوم و سوم ادجوانت ناقص)، واکسن ثلاث، DTP به تنهایی و سرم فیزیولوژی استریل (به عنوان گروه شاهد) در ۳ نوبت و به فواصل ۲۱ روز تزریق شد. پیش از هر نوبت تزریق و ۲۱ روز پس از سومین تزریق در همان روز از خرگوش خون‌گیری به عمل آمد و سرم آنها برای اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی در فریزر نگهداری گردید. آزمایش آگلوتیناسون سرم‌ها با سوسپانسیون کشته شده باکتری بررسی شد و نتایج لوله‌های شاهد با بقیه‌ی لوله‌ها مقایسه و عکس رقت‌ها به عنوان تیتر آنتی‌بادی در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** در این پژوهش، ایمونیزاسیون خرگوش‌ها ضد باکتری و همراه با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، ادجوانت فروند و DTP افزایش تیتر آنتی‌بادی ضد این باکتری مشاهده شد. میانگین تیتر آنتی‌بادی خرگوش‌های ایمونیزه شده با DTP بعد از تزریق نوبت سوم واکسن به طور معنی‌داری بیشتر از خرگوش‌های ایمونیزه شده با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم و فروند بود (p=۰/۰۴۹). همچنین میانگین تیتر آنتی‌بادی خرگوش‌های ایمونیزه شده با ادجوانت فروند بیشتر از خرگوش‌های ایمونیزه شده با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم (p=۰/۲۷) بود ولی این تفاوت معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** در این بررسی، از بین ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، ادجوانت فروند و واکسن DTP، در خرگوش‌های ایمونیزه شده با DTP افزایش چشم‌گیر تیتر آنتی‌بادی ضد استافیلوکوکوس اورئوس کپسول‌دار تایپ ۵ مشاهده شد. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای ایجاد پاسخ ایمنی بهتر، از واکسن ثلاث (DTP) به عنوان ادجوانت در ترکیب با سوسپانسیون کشته شده علیه این باکتری در انسان استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** **استافیلوکوک اورئوس کپسول‌دار، ادجوانت، هیدروکسید آلومینیوم، فروند، واکسن ثلاث (DTP)، خرگوش.**

تعداد صفحات: ۸
تعداد جدول‌ها: ۱
تعداد نمودارها: ۱
تعداد منابع: ۲۱

**آدرس نویسندهٔ مسئول:** دکتر سید اصغر هوایی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
E-mail: havaei@med.mui.ac.ir



www.mui.ac.ir

## مقدمه

استافیلوکوک اورئوس از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی و یکی از علل شناخته شده‌ی عفونت‌های سیستمیک است و بسیاری از بیماران از عوارض باکتریمی آن مانند اندوکاریت، آرتریت و استئومیلیت رنج می‌برند (۱)؛ حدود ۹۰ درصد استافیلوکوک اورئوس جدا شده از بیماران، دارای کپسول پلی‌ساکاریدی می‌باشد (۲). تاکنون ۱۱ سروتایپ استافیلوکوک اورئوس کپسول‌دار شناسایی و ساختمان شیمیایی کپسول تعدادی از آنها مشخص شده است (۲). آنالیزهای شیمیایی بیانگر آن است که جنس این کپسول‌ها پلی‌ساکاریدی و حاوی اسید آمینویورونیک می‌باشد (۳). پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان دهنده‌ی آن است که کپسول از فاکتورهای ویرولانس باکتری و دارای آنتی‌ژن‌های محافظت کننده است (۴). استافیلوکوک‌های کپسول‌دار نسبت به فاگوسیتوز مقاوم‌تر از استافیوکوک‌های بدون کپسول است؛ حضور آنتی‌بادی‌های اختصاصی کپسولی، به افزایش فاگوسیتوز استافیلوکوک‌های کپسول‌دار منجر می‌شود (۴)؛ پژوهش‌های اپیدمیولوژیک در آمریکا و اروپا شیوع سروتایپ‌های ۵ و ۸ را در بین نمونه‌های بالینی جدا شده از انسان، گاو و ماکیان نشان داده است (۵). همچنین ۸۵-۸۰ درصد استافیلوکوک اورئوس کپسول‌دار جدا شده از باکتریمی و سپتی‌سمی بیماران، مربوط به سروتایپ‌های میکروکپسول‌دار تایپ ۵ و ۸ می‌باشند (۶). تحقیقات پیشین نشان داده است که آنتی‌بادی‌های ضد استافیلوکوکوس اورئوس کپسول‌دار تایپ ۵ موجب افزایش قابل توجه ایمنی در آندوکاردیت‌های استافیلوکوکی موش نشده است (۶). بنابراین یافتن ادجوانتی مناسب برای افزایش چشم‌گیر تیتر آنتی‌بادی برای تهیه‌ی واکسن ضد این باکتری لازم به نظر می‌رسد.

در این پژوهش اثر ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، فروند و واکسن ثلاث (DPT) در افزایش تیتر آنتی‌بادی ضد استافیلوکوک اورئوس کپسول‌دار تایپ ۵ در خرگوش مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

## روش‌ها

در این پژوهش پژوهش (تجربی) ۳۰ رأس خرگوش سفید نر بالغ از نژاد نیوزلندی با سن ۶-۴ ماه و وزنی حدود ۲/۵ کیلوگرم از انستیتو رازی تهیه و به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند. به گروه اول سوسپانسیون کشته شده استافیلوکوک اورئوس کپسول‌دار تایپ ۵ (سویه Reynolds، تهیه شده از انستیتو پاستور فرانسه) بدون ادجوانت، به گروه دوم سوسپانسیون کشته شده استافیلوکوک اورئوس کپسول‌دار تایپ ۵ همراه با هیدروکسید آلومینیوم، به گروه سوم سوسپانسیون باکتری کشته شده همراه با ادجوانت فروند (در تزریق اول ادجوانت کامل و در تزریق دوم و سوم ادجوانت ناقص)، گروه چهارم سوسپانسیون باکتری کشته شده با واکسن ثلاث تهیه شده از مؤسسه‌ی رازی، به گروه پنجم واکسن ثلاث (DTP) به تنهایی و به گروه ششم سرم فیزیولوژی استریل به عنوان گروه شاهد منفی به مقدار ۰/۸ سی‌سی از راه عضلانی تزریق شد (۷). این تزریقات در سه نوبت و به فواصل هر ۲۱ روز تکرار شد و ۲۱ روز پس از سومین تزریق و در همان روز از ورید مارژینال گوش خرگوش خونگیری به عمل آمد (۸)؛ سرم نمونه‌ها جدا شد و تا قبل از انجام آزمایش آگلوتیناسیون برای اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی در دمای $-۲۰^{o}C$ نگهداری گردید.



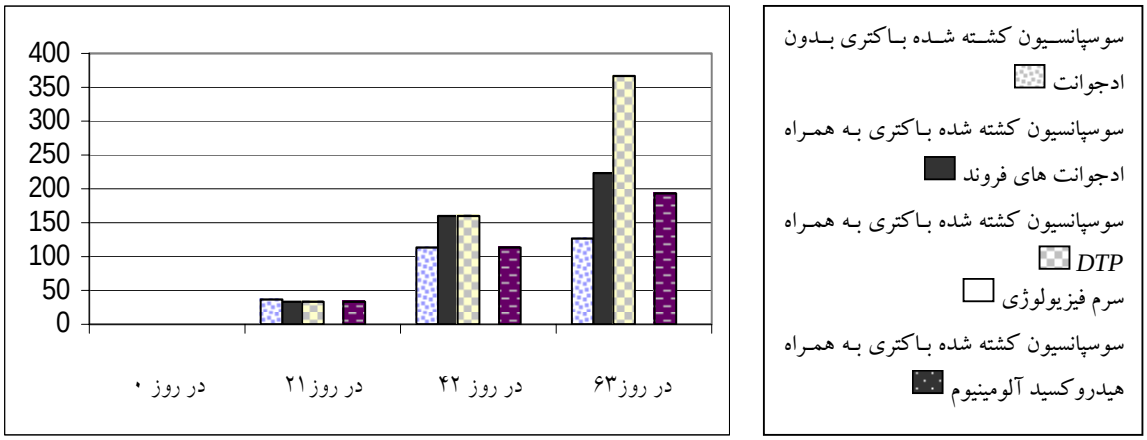
www.mui.ac.ir

برای انجام آزمایش آگلوتیناسیون، یازده لوله‌ی آزمایش در جا لوله‌ای قرار داده شد که در لوله‌ی اول ۰/۹ میلی‌لیتر و در لوله‌های بعدی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته، سپس به لوله‌ی اول ۰/۱ میلی‌لیتر سرم خرگوش اضافه گردید؛ پس از مخلوط کردن با سرم فیزیولوژی مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از آن به لوله‌ی دوم منتقل شد و این کار تا لوله‌ی دهم ادامه یافت و از لوله‌ی دهم مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر پس از مخلوط کردن دور ریخته شد. لازم به یادآوری است که لوله‌ی شماره‌ی ۱۱ به عنوان کنترل آنتی‌ژن و فاقد سرم خرگوش بود. آنگاه به تمام لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون کشته شده استافیلوکوک اورئوس کپسول‌دار تایپ ۵ (معادل لوله‌ی شماره‌ی یک مک فارلند ۱۰۸× ۳ باکتری در هر میلی‌لیتر) اضافه شد و پس از مخلوط کردن، لوله‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ساعت آنکوبه شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. بعد از پایان سانتریفوژ، ابتدا نتیجه‌ی لوله شاهد و سپس بقیه‌ی لوله‌ها خوانده شد. عکس رقت آخرین لوله‌ای مشاهده شده در آگلوتیناسیون، به عنوان تیتر آنتی‌بادی در نظر گرفته می‌شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS, Inc. Chicago, IL) به وسیله‌ی آزمون paired t-test انجام شد.

## یافته‌ها

در این پژوهش، گروه دریافت کننده‌ی DTP تنها به عنوان شاهد برای گروه دریافت کننده‌ی سوسپانسیون کشته شده باکتری همراه با DTP به کار رفته است. میانگین نتایج تیتر آنتی‌بادی در چهار مقطع زمانی مختلف خونگیری گروه DTP، فقط از میانگین نتایج تیتر آنتی‌بادی در چهار مقطع زمانی مختلف خونگیری گروه سوسپانسیون کشته شده باکتری همراه با DTP کسر گردید. بنابراین منظور از به کار بردن گروه سوسپانسیون کشته شده باکتری همراه با DTP در نتایج و بحث، تفاضل گروه DTP به تنهایی از گروه سوسپانسیون کشته شده باکتری مخلوط با DTP می‌باشد که در نتایج ذکر گردیده است.

اثر متقابل بین نوع واکسن تزریقی و زمان خونگیری در افزایش تیتر آنتی‌بادی، بین دو گروه مورد آزمون سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت و سوسپانسیون کشته شده باکتری همراه با هیدروکسید آلومینیوم (p=۰/۲۷) و همچنین بین دو گروه مورد




**نمودار ۱. مقایسه میانگین تیتر آنتی‌بادی در گروههای مختلف در مقاطع خونگیری به فواصل ۲۱ روز**



www.mui.ac.ir

جدول ۱. مقایسه میانگینی تیتر آنتی‌بادیهای گروههای مختلف در مقطع خونگیری به فواصل ۲۱ روز

| مقطع خونگیری | مواد تزریق شده | میانگین تیتر آنتی بادی (انحراف معیار) | P value |
|---|---|---|---|
| روز ۲۱ | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۸/۹)۳۶ | ۰/۰۰۱ |
| | سرم فیزیولوژی | ۰ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۸/۹)۳۶ | ۰/۸۳ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه ادجوانت فروند | (۱۰/۷)۳۲ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۸/۹)۳۶ | ۰/۰۷۳ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه DTP | (۲۲/۸)۳۲ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۸/۹)۳۶ | ۰/۲۷ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه هیدروکسید آلومنیوم | (۱۰/۹)۳۲ | |
| روز ۴۲ | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۳۳/۸)۱۱۲ | ۰/۰۰۱ |
| | سرم فیزیولوژی | ۰ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۳۳/۸)۱۱۲ | ۰/۰۸۳ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه ادجوانت فروند | (۳۶/۵)۱۶۰ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۳۳/۸)۱۱۲ | ۰/۲۷ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه DTP | (۳۷)۱۷۶ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۳۳/۸)۱۱۲ | ۰/۲۵ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه هیدروکسید آلومینیوم | (۲۷/۹)۱۶۸ | |
| روز ۶۳ | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۲۳/۸)۱۲۸ | ۰/۰۰۱ |
| | سرم فیزیولوژی | ۰ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۲۳/۸)۱۲۸ | ۰/۰۸۳ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه ادجوانت فروند | (۲۷/۶)۲۲۴ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۲۳/۸)۱۲۸ | ۰/۰۴۹ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه ادجوانتDTP | (۲۴/۸)۳۶۸ | |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت | (۲۳/۸)۱۲۸ | ۰/۲۷ |
| | سوسپانسیون کشته شده باکتری به همراه هیدروکسید آلومینیوم | (۱۲/۳)۱۹۲ | |

آزمون سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت و سوسپانسیون کشته شده باکتری همراه با ادجوانت فروند از اختلاف معنی‌داری برخوردار نبودند (p=۰/۰۸۳). در حالی که بین دو گروه سوسپانسیون کشته شده باکتری بدون ادجوانت و سوسپانسیون باکتری همراه با DTP در خونگیری چهارم بعد از تزریق نوبت سوم واکسن، تغییر معنی‌داری مشاهده شد (p=۰/۰۴۹) (جدول ۱، نمودار ۱). تزریق سوسپانسیون باکتری کشته شده بدون ادجوانت در مقایسه با تزریق سرم فیزیولوژی به تنهایی افزایش چشم‌گیر تیتر آنتی‌بادی را نشان داد (p=۰/۰۰۱) (جدول ۱).

## بحث

در این پژوهش که با هدف تعیین اثر ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم، ادجوانت فروند و واکسن ثلاث (DTP) در تولید آنتی‌بادی علیه استافیلوکوکوس اورئوس کپسول دار تایپ ۵ در خرگوش انجام شد، میانگین تیتر آنتی‌بادی در خرگوش‌های ایمونیزه شده



www.mui.ac.ir

با ادجوانت فروند، بیشتر از خرگوش‌های ایمونیزه شده با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم بود ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین میانگین تیتر آنتی‌بادی خرگوش‌های ایمونیزه شده با DTP، به طور معنی‌داری بیشتر از خرگوش‌های ایمونیزه شده با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم و ادجوانت فروند بود. این یافته‌ی ما با پژوهش Shu و همکاران مطابقت دارد، آنها ادجوانت فروند و هیدروکسید آلومینیوم را به همراه استرپتوکوکوس بوویس در گاو به کار برده‌اند که ادجوانت فروند در این ترکیب موجب افزایش تیتر آنتی‌بادی بیشتری نسبت به هیدروکسید آلومینیوم شده ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (۹). دلایل این یافته به خوبی معلوم نیست؛ در پژوهش دیگری Giraudo و همکاران کاهش شدید ماستیت را در گاوهای واکسینه شده با استافیلوکوکوس آرئوس کنژوگه شده با هیدروکسید آلومینیوم نشان دادند (۱۰). ادجوانت فروند یکی از قوی‌ترین ادجوانت‌هایی است که تاکنون توصیف شده است و به میزان زیادی برای افزایش پاسخ ایمنی حیوانات آزمایشگاهی برای اهداف تحقیقاتی به کار می‌رود. عوارض جانبی آن مانند گرانولونوماتور آبسه و التهاب در محل تزریق، درد شدید، تب، احتمال آسیب دائمی بافت، القای بیماری‌های خود ایمنی و افزایش حساسیت می‌باشد. کاربرد ادجوانت فروند برای انسان مجاز نبوده، سبب ایجاد آبسه می‌گردد (۱۱). کاربردی‌ترین ادجوانت‌ها در انسان هیدروکسید آلومینیوم یا فسفات آلومینیوم می‌باشد؛ هیدروکسید آلومینیوم ادجوانتی است که برای استفاده‌ی انسانی توسط سازمان غذا و دارو مجاز شناخته شده است (۱۲-۱۱). یافته‌های دیگر نشان می‌دهد که در ترکیب با پاستور لاهمولیتیکا در مدل حیوانی گوسفند و همچنین در ترکیب با آنتی‌ژن‌های مشتق شده از ویروس هپاتیت B در خوکچه‌ی هندی، ادجوانت فروند به طور معنی‌داری موجب افزایش تیتر آنتی‌بادی نسبت به هیدروکسید آلومینیوم شده است (۱۴-۱۳). Tollersrud و همکاران نیز نشان دادند که ادجوانت روغنی، یکی از ادجوانت‌هایی است که در ترکیب با سوسپانسیون کشته شده استافیلوکوکوس آرئوس کپسول‌دار تایپ ۵ منجر به افزایش چشم‌گیر تیتر آنتی‌بادی در گاو می‌شود (۱۵). نتایج حاصل از این پژوهش قابل مقایسه با سایر بررسی‌هایی است که در آنها واکسن ثلاث (DTP) را در ترکیب با واکسن هموفیلوس آنفوآنزا تایپ b و واکسن آنفلوآنزای a در موش بررسی کردند و نشان دادند که در موش‌های ایمونیزه شده تیتر آنتی‌بادی ضد این باکتری و ویروس، به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است (۱۷-۱۶)، در پژوهش Barra و همکاران نشان داده شد که می‌توان واکسن هموفیلوس انفلونزای تایپ b را با موفقیت در یک سرنگ همراه با واکسن DTP برای ایمونیزاسیون شیرخواران به کار برد که این ترکیب باعث افزایش چشم‌گیر تیتر آنتی‌بادی ضد این باکتری در شیرخواران می‌شود (۱۸). همچنین در پژوهشی دیگر، واکسن هموفیلوس آنفلوآنزای تایپ b را با DTP مخلوط و در یک تزریق واحد برای شیرخواران به کار بردند، بدون اینکه از ایمنی‌زایی هر یک کم شود یا باعث بروز عوارض ناخواسته‌ی بیشتر گردد (۱۹). در پژوهش Puumalainen نشان داده شد که استفاده از واکسن پنوموکوک کنژوکه با توکسوئید دیفتری منجر به افزایش چشم‌گیر آنتی‌بادی ضد باکتری پنوموکوک در نوزادان فیلیپینی می‌شود (۲۰). در پژوهشی دیگر، DTP را در ترکیب با واکسن پولیومیلیت تزریقی در



www.mui.ac.ir

کودکان به کار برده‌اند که این ترکیب موجب محافظت در برابر فلج اطفال شده است (۲۱). استفاده از واکسن DTP در ترکیب با واکسن‌های دیگر، چنانچه از ایمنی‌زایی هرکدام از واکسن‌ها کم نشود، نیاز به تزریق اضافی ندارد، همچنین تداخل در وعده‌های توصیه شده واکسن‌ها کم‌تر ایجاد می‌شود، در نتیجه یک استراتژی ساده برای ایمونیزاسیون فراهم می‌کند (۱۷).

از بین سه ادجوانت مورد بررسی در این پژوهش، برای ایجاد پاسخ ایمنی بهتر و قوی‌تر، پیشنهاد می‌شود که از واکسن ثلاث (DTP) به عنوان ادجوانت در ترکیب با سوسپانسیون کشته شده استافیلوکوکوس اورئوس کپسول دار تایپ ۵، در پژوهش‌های انسانی نیز استفاده گردد تا چنانچه نتایج مشابهی به دست آید از آن بتوان در ایمونیزاسیون انسانی ضد این سوش باکتری استفاده شود.

## منابع


1. Willett HP. Staphylococcus. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM, editors. Zinsser microbiology. Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1992: 401-16.
2. Nilsson IM, Lee JC, Bremell T, Ryden C, Tarkowski A. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. Infect Immun 1997; 65(10):4216-21.
3. Lee JC, Park JS, Shepherd SE, Carey V, Fattom A. Protective efficacy of antibodies to the Staphylococcus aureus type 5 capsular polysaccharide in a modified model of endocarditis in rats. Infect Immun 1997; 65(10):4146-51.
4. Karakawa WW. The role of capsular antigens in Staphylococcus aureus immunity. Zentralbl Bakteriol 1992; 277(4):415-8.
5. Fattom A, Schneerson R, Watson DC, Karakawa WW, Fitzgerald D, Pastan I, et al. Laboratory and clinical evaluation of conjugate vaccines composed of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharides bound to Pseudomonas aeruginosa recombinant exoprotein A. Infect Immun 1993; 61(3):1023-32.
6. Duckworth G, Cookson B, Pearson A, Crowcroft N. Surveillance for S aureus bacteraemias is compulsory. BMJ 2002; 324(7331):240-1.
7. Leenaars PP, Koedam MA, Wester PW, Baumans V, Claassen E, Hendriksen CF. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. Lab Anim 1998; 32(4):387-406.
8. Delves PJ. Antibody production. Essential techniques. Chichester: Wiley and sons Ltd; 1997. p.29-32.
9. Shu Q, Hillard MA, Bindon BM, Duan E, Xu Y, Bird SH, et al. Effects of various adjuvants on efficacy of a vaccine against Streptococcus bovis and Lactobacillus spp in cattle. Am J Vet Res 2000; 61(7):839-43.
10. Giraudo JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraudo AT, Bogni C, et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. J Dairy Sci 1997; 80(5):845-53.
11. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. Vaccine 1993; 11(3):293-306.
12. Elliis RW. Vaccine: New approaches to immunological problem. Boston: Butterworth-Heinemann; 1992.p.431-49.
13. Wells PW, Gilmour NJ, Burrells C, Thompson DA. A serological comparison of Pasteurella haemolytica vaccines containing different adjuvants. Res Vet Sci 1979; 27(2):248-50.
14. Sanchez Y, Ionescu-Matiu I, Dreesman GR, Kramp W, Six HR, Hollinger FB, et al. Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigens: comparative activity of Freund complete adjuvant alum, and liposomes. Infect Immun 1980; 30(3):728-33.
15. Tollersrud T, Zernichow L, Andersen SR, Kenny K, Lund A. Staphylococcus aureus capsular polysaccharide type 5 conjugate and whole cell vaccines stimulate antibody responses in cattle. Vaccine 2001; 19(28-29):3896-903.
16. Tamizifar H, Robinson A, Jennings R, Potter CW. Immune response and protection against influenza. An infection in mice immunised with subunit influenza a vaccine in combination with whole cell or acellular DTP vaccine. Vaccine 1995; 13(16):1539-46.
17. Potter CW, Tamizifar H, Jennings R. Immune response of mice to immunization with subunit influenza A vaccine in DTP vaccine. Vaccine 1995; 13(3):253-60.




www.mui.ac.ir

18. Barra A, Dagan R, Preud'homme JL, Bajart A, Danve B, Fritzell B. Characterization of the serum antibody response induced by Haemophilus influenzae type b tetanus protein-conjugate vaccine in infants receiving a DTP-combined vaccine from 2 months of age. Vaccine 1993; 11(10):1003-6.
19. Begg NT, Miller E, Fairley CK, Chapel HM, Griffiths H, Waight PA, et al. Antibody responses and symptoms after DTP and either tetanus or diphtheria Haemophilus influenzae type B conjugate vaccines given for primary immunisation by separate or mixed injection. Vaccine 1995; 13(16):1547-50.
20. Puumalainen T, Zeta-Capeding MR, Kayhty H, Lucero MG, Auranen K, Leroy O, et al. Antibody response to an eleven valent diphtheria- and tetanus-conjugated pneumococcal conjugate vaccine in Filipino infants. Pediatr Infect Dis J 2002;21(4):309-14.
21. Qureshi AW, Zulfiqar I, Raza A, Siddiqi N. Comparison of immunogenicity of combined DPT--inactivated injectable polio vaccine (. J Pak Med Assoc 1989; 39(2):31-5.



www.mui.ac.ir

**Original Article**

**Journal of Isfahan Medical School**
**Vol 26, No 88, Spring 2008**

**Received:** 26.8.2007
**Accepted:** 7.2.2008

# The effect of Aluminium hydroxide, Freund's adjuvant and DTP vaccine on immunization of rabbit against encapsulated Staphylococcus aureus type 5

Seyed Asghar Havaei PhD*, Akbar Mirsalehian PhD**, Farzaneh Bazarjani MSc***, Ahmad Ghavaminejad PhD****, Kobra Bamdad MS***. Farkhondeh Poursina MSc****, Hasan Tamizifar PhD*.

* Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences
** Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences
*** Expert, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences
**** Expert, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences

## Abstract

**Background:** Immunization of rabbit against Staphylococcus aureus type 5 did not increase antibody titer significantly in previous study. We proposed that lack of protection is due to low immunogenicity of this bacterium and a suitable adjuvant is needed to augment antibody production against it. In this study the effect of aluminium hydroxide [$Al(OH)_3$], Freund's adjuvant and DTP vaccine on immunization of rabbit against encapsulated S. aureus type 5 by agglutination method was considered.

**Methods:** 30 male New Zeeland white rabbits (4-6 months) were grouped in 6. They were injected intramuscularly using suspension of killed encapsulated S. aureus type 5 (strain Reynolds) with and without adjuvant. The last two groups were injected DTP vaccine and saline alone. Injections were done three times within 21 days intervals; blood sample was obtained from marginal ear vein before every injection and 21 days after the last injection and sera were collected in -20ºC. Agglutination method was employed for detection of antibody titer.

**Findings:** Immunization of rabbits to encapsulated s. aureus type 5 with $Al(OH)_3$, Freund's adjuvant and DTP vaccine showed rise in antibody titer against it. Mean antibody titer of immunized rabbits with DTP vaccine after the third injection was more than those immunized with $Al(OH)_3$ and Freud's adjuvant ($p=0.049$). Also mean antibody titer in rabbits immunized with Freund's adjuvant was more than those immunized with $Al(OH)_3$ but this difference was not significant ($p=0.27$).

**Conclusion:** In this study, DTP vaccine induced higher antibody titer against encapsulated S. aureus type 5 than $Al(OH)_3$ and Freund's adjuvant. Therefore, it is suggested that DTP vaccine may be used as an adjuvant with suspension of killed encapsulated S. aureus type 5 in rabbit.

**Key words:** **Encapsulated staphylococcus aureus, adjuvant, aluminium hydroxide, Freund, DTP vaccine**

**Page count:** 8
**Tables:** 1
**Figures:** 1
**References:** 21

**Address of Correspondence:** Dr. Seyyed Asghar Havaei, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
E-mail: havaei@med.mui.ac.ir



www.mui.ac.ir